

Institut für Virologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktorin: Univ.- Prof. Dr. med. Sigrun Smola

**Untersuchung zur Prävalenz von
Frühsommer-Meningoenzephalitis-Viren, von
Borrelia burgdorferi sensu lato und *Anaplasma
phagocytophilum* in Zecken der Art *Ixodes ricinus*
in Rheinland-Pfalz und im Saarland (Deutschland)**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin*

**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017**

vorgelegt von Melanie Müller
geb. am: 01.08.1990 in Landstuhl

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	5
B Einleitung	9
B.1 Literaturübersicht	10
B.1.1 <i>Ixodes ricinus</i>	10
B.1.1.1 Verbreitung und saisonale Aktivität	12
B.1.2 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV)	13
B.1.2.1 Taxonomie und molekularbiologische Eigenschaften .	13
B.1.2.2 Transmission	14
B.1.2.3 Epidemiologie	14
B.1.2.3.1 Europa	15
B.1.2.3.2 Deutschland	16
B.1.2.3.3 Rheinland-Pfalz	18
B.1.2.3.4 Saarland	19
B.1.2.4 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention . .	21
B.1.3 <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	22
B.1.3.1 Taxonomie, Morphologie und Genom	22
B.1.3.2 Transmission, Vektoren und Erregerreservoir	22
B.1.3.3 Epidemiologie	23
B.1.3.4 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention . .	25
B.1.4 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	27
B.1.4.1 Taxonomie und Morphologie	27
B.1.4.2 Genom	28
B.1.4.3 Transmission, Vektoren und Erregerreservoir	28
B.1.4.4 Epidemiologie	29
B.1.4.5 Pathogenese	30
B.1.4.6 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention . .	31
B.2 Zielsetzung	33
C Material und Methoden	35
C.1 Sammlung der Zecken	35
C.1.1 Auswahl der Sammelorte	35

C.1.2	Ablauf der Sammlung	38
C.2	Molekularbiologische Methoden	39
C.2.1	Homogenisierung der Zecken	39
C.2.2	Extraktion von Nukleinsäuren	40
C.2.2.1	Grundzüge des Extraktionsverfahrens	40
C.2.2.2	Aufreinigungprotokoll	40
C.2.3	Nachweis von Nukleinsäuren	41
C.2.3.1	Prinzip der Real-time PCR	41
C.2.3.2	Nachweis von FSME-Virus-RNA	43
C.2.3.3	Nachweis von Borrelien und Anaplasmen-DNA	45
C.3	Verwendete Reagenzien und Geräte	49
C.4	Statistische Auswertung	50
D	Ergebnisse	51
D.1	Ergebnisse der Zeckensammlung	51
D.2	Erregerprävalenz in Ixodes ricinus	52
D.2.1	Prävalenz von FSMEV-RNA	52
D.2.2	Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA	52
D.2.2.1	Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA nach Sammelort	52
D.2.2.2	Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA nach Stadium und Geschlecht	54
D.2.3	Koinfektionen	56
E	Diskussion	57
E.1	Zeckensammlung	57
E.2	Erregerprävalenz in Ixodes ricinus	59
E.2.1	Prävalenz von FSMEV RNA	59
E.2.2	Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA	63
E.2.3	Koinfektionen	69
F	Literaturverzeichnis	71
G	Abkürzungsverzeichnis	95

H	Anhang	97
H.1	Sammelorte	97
H.1.1	Rheinland-Pfalz	97
H.1.2	Saarland	99
I	Danksagung	103
J	Publikationsliste	105

A Zusammenfassung

Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) gilt als Hauptüberträger der bedeutendsten zeckenübertragenen Erkrankungen in Deutschland. So werden die durch *Borrelia burgdorferi sensu lato* verursachte Lyme-Borreliose, die durch *Anaplasma phagocytophilum* ausgelöste humane granulozytäre Anaplasmose (HGA), sowie die durch das gleichnamige Virus verursachte Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) durch *I. ricinus* übertragen. Vor dem Hintergrund des sich kontinuierlich verändernden Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* sind Untersuchungen zur aktuellen Verbreitung im Hinblick auf das sich ebenfalls wandelnde Infektionsrisiko für den Menschen von Bedeutung. Ziel dieser Arbeit ist daher die Erhebung eines qualitativen Basisdatensatzes zur Prävalenz der genannten Erreger in *I. ricinus* als Grundlage eines systematischen Monitoringprogramms im Saarland und in Rheinland-Pfalz.

Dazu wurden zwischen Juni und September 2011 insgesamt 1799 nüchterne Zecken der Art *I. ricinus*, darunter 400 Adulte, 1395 Nymphen und 4 Larven, an 15 Fangorten in Rheinland-Pfalz und im Saarland (Deutschland) mit Hilfe der wissenschaftlich anerkannten Flaggenmethode gesammelt. Die Zecken wurden nach vorausgegangener Nukleinsäureextraktion mittels real-time PCR auf das Vorhandensein der genannten Erreger überprüft.

Es gelang erstmalig der Nachweis des FSME-Virus in den als FSME-Risikogebieten ausgewiesenen Landkreisen Birkenfeld in Rheinland-Pfalz und dem Saarpfalz-Kreis im Saarland, was die Annahme von Naturherden in beiden Risikogebieten untermauert. Bezogen auf die Gesamtzahl aller untersuchten *I. ricinus* betrug die FSME-Virus-Prävalenz 0,11%.

Mit 20% war die Zahl der mit *B. burgdorferi sensu lato* infizierten Zecken am größten. Dies unterstreicht die Rolle der Borreliose als häufigste zeckenübertragene Erkrankung in Deutschland.

Deutlich weniger Zecken (1,8%) waren Träger von *A. phagocytophilum*. Auch wenn in Deutschland, im Gegensatz zu einigen Nachbarstaaten, bisher kein Fall einer HGA aufgetreten ist, deutet der Nachweis von *A. phagocytophilum* in Zecken im Saarland und in Rheinland-Pfalz auf die Möglichkeit einer Infektion hin.

Auf die dargestellten Ergebnisse aufbauend könnte zum Beispiel die Typisierung der Pathogene helfen ihre Entwicklung über die Zeit hinweg zu beschreiben und ein

genaueres Bild ihrer Verbreitung zeichnen.

Schlussendlich soll der Zufallsfund eines ungesogenen, adulten Weibchens, der sich in Deutschland immer weiter ausbreitenden Art *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Rheinland-Pfalz Erwähnung finden. Das in dieser Arbeit untersuchte Exemplar, war mit keinem der drei Erreger infiziert.

Summary

Tick Survey For The Prevalence of Tick-Borne-Encephalitis-Virus, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Saarland and Rhineland-Palatinate (Germany)

Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) acts as main vector of numerous tick-borne zoonoses in Germany. The most common tick-borne disease is Lyme Borreliosis, which is caused by the spirochaete *Borrelia burgdorferi sensu lato*. In Germany, several other bacterial pathogens have been found to circulate in ticks, amongst them *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of human granulocytic anaplasmosis (HGA). Tick-borne encephalitis (TBE) is recognized as the most important viral tick-borne disease in Germany. Changes in the expansion of tick-borne infections occur as a result of several factors, including climate change. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate the current distribution and prevalence rate of those three pathogens, as basis and part of a future monitoring programme in Saarland and Rhineland-Palatinate.

From June to September 2011 a total of 1799 questing *I. ricinus* ticks were sampled by flagging at 15 collection sites in two German states (Saarland and Rhineland-Palatinate). 400 out of those ticks were adults, 1395 nymphs and 4 were larvae. DNA-extracts of *I. ricinus* were investigated by real-time PCR.

TBEV was detected in two field-collected ticks, representing the first finding of TBEV in ticks within the official risk areas of Saarland (Saarpfalz-Kreis) and Rhineland-Palatinate (Birkenfeld), which provides evidence for the occurrence of natural foci within this region. The overall TBE prevalence rate was 0.11% in the analysed regions of both federal states.

Supporting its role as the most common tick-borne pathogen in Germany, *B. burgdorferi sensu lato* was the predominant species to be detected in *I. ricinus*. 20% and 1.8% of all ticks contained *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*, respectively.

The results demonstrate the potential risk of infection of acquiring an anaplasmosis, although a case of HGA in Germany has not been recorded up to now.

Further investigations such as the genotyping of the above mentioned pathogens may be helpful to determine their range of distribution and their development over time.

Finally, one female non-engorged adult tick of the species *Dermacentor reticulatus* (*Acari: Ixodidae*) has been sampled in Rhineland-Palatinate. This finding confirms the spread of this species, in Germany. None of the three investigated microorganisms has been detected in this tick.

B Einleitung

Zecken können eine Vielzahl von Infektionserregern übertragen, welche ein großes gesundheitliches Risiko bergen und hohe Krankheitskosten verursachen. Als bedeutendste zeckenübertragene Erkrankungen in Deutschland sind dabei die Lyme-Borreliose, sowie die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) zu nennen [Hübler, 2008]. Außerdem gewinnen zunehmend weitere Pathogene an Bedeutung, wie die durch *A. phagocytophilum* verursachte, für den Menschen potentiell lebensbedrohliche Anaplasmose [Pluta et al., 2011]. Hinzu treten Koinfektionen dieser Erreger, welche zu unspezifischen Beschwerden und schweren Verläufen mit hoher Letalität führen können [Stanek et al., 2012].

Hauptüberträger der genannten Erkrankungen ist *Ixodes ricinus*, die häufigste in Deutschland am Menschen parasitierende Zeckenart. Ihr Verbreitungsgebiet hat sich in den letzten Jahren verändert. Gleichzeitig ist die Inzidenz der durch sie übertragenen Infektionskrankheiten gestiegen. Als Ursachen hierfür werden, neben politischen und sozioökonomischen Handlungsweisen des Menschen, in erster Linie der globale Klimawandel und die damit für *I. ricinus* veränderten Lebensbedingungen diskutiert [Süss et al., 2008; Kampen & Werner, 2011].

So ist in Deutschland im Rahmen des Klimawandels ein Anstieg der Jahresmitteltemperatur bodennaher Luft im vergangenen Jahrhundert zwischen 1901 und 2009 um rund ein Grad Celsius zu verzeichnen, allerdings mit regional unterschiedlichen Ausprägungen. Beispielsweise sind die stärksten Zunahmen im Westen Deutschlands, unter anderem im Saarland und Rheinland-Pfalz, registriert worden [Eis et al., 2011]. Um den Einfluss der weiter voranschreitenden globalen Erwärmung auf die geographische Verbreitung der Erreger und das damit verbundene, tatsächliche Infektionsrisiko für die Bevölkerung einschätzen zu können, sind systematische Untersuchungen zur gegenwärtigen Verbreitung klimasensitiver Infektionskrankheiten notwendig. Die vorliegende Arbeit greift diesen Bedarf auf und stellt die Erhebung eines qualitativen Basisdatensatzes zur Prävalenz des FSME-Virus (FSMEV), sowie von *Borrelia burgdorferi sensu lato* und *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* mittels molekularbiologischer Methoden als Grundlage für ein systematisches Monitoringprogramm im Saarland und in Rheinland-Pfalz dar.

B.1 Literaturübersicht

B.1.1 *Ixodes ricinus*

I. ricinus, der gemeine Holzbock, gehört zur Familie der Schildzecken (*Ixodidae*). Charakteristisch für diese Familie besteht ihr Entwicklungszyklus aus drei Stadien (siehe Abbildung 1) Von der Larve zur Nymphe bis hin zur adulten Zecke vergehen in Deutschland in Abhängigkeit verschiedener Umweltfaktoren (Witterungsbedingungen, Wirtsverfügbarkeit etc.) etwa zwei bis drei Jahre. Bei adulten Zecken wird zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht unterschieden [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009]. Jedem Stadienwechsel geht eine Blutmahlzeit von etwa zwei Tagen Dauer bei Larven und bis zu etwa zehn Tagen bei Adulten voraus [Süss et al., 2008]. Nach dem Saugakt fällt die Zecke vom Wirt ab und häutet sich am Boden. Dementsprechend benötigt *I. ricinus* während ihres Lebenszyklus drei verschiedene Wirte [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009].

Männliche Zecken können als einzige mehrmals kleinere Portionen Blut aufnehmen. Sie begatten Weibchen im Freien oder während diese eine Blutmahlzeit auf dem Wirt einnehmen. Nach der Begattung sterben die Männchen. Weibchen legen am Boden je nach Menge des aufgenommenen Blutes etwa 200 - 5000 Eier, wobei sie selbst zu Grunde gehen. Aus den Eiern schlüpfen die Larven und komplettieren so den Entwicklungszyklus [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009].

Der gemeine Holzbock ist wenig wirtsspezifisch [Petney et al., 2011]. Er lauert in der Vegetation auf passierende Wirte. Larven halten sich bodennah auf, Nymphen und Adulte erklimmen dagegen, in Abhängigkeit der vorliegenden mikroklimatischen Bedingungen, Höhen von einem halben bis zu einem Meter [Mejlon & Jaenson, 1997]. Daher sind Larven vor allem auf Kleinsäugetern zu finden, während adulte Zecken und Nymphen vermehrt größere Säugetiere, wie zum Beispiel Rehe, befallen [Mejlon & Jaenson, 1997]. Am Menschen können *I. ricinus* Zecken jedes Entwicklungsstadiums saugen [Gern, 2005].

Mit Hilfe des Haller'schen Organs, eines Sinnesorgans, welches sich auf dem vorderen Beinpaar von *I. ricinus* befindet, können mechanische, chemische und thermische Reize wahrgenommen werden [Süss et al., 2008]. Augen besitzt der gemeine Holzbock nicht, jedoch ermöglichen Photosensillen¹ eine Unterscheidung von hell und

¹Sensillen = Sinnesorgane in bzw. auf dem Außenskelett von Arthropoden [Spektrum.de, a]



Abbildung 1: Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus* (Vergrößerung $3,5\times$) a) und b) adulte Zecke: a) weiblich b) männlich; c) Nymphe; d) Larve: d1) Larve (Vergrößerung $35\times$), eigenes Bildmaterial

dunkel.

Streift der Wirt die Zecke von der Vegetation ab, hält sie sich mit Hilfe von, am vorderen Beinpaar befindlichen, Krallen fest und sucht eine versteckte Hautstelle auf.

Mit Hilfe ihres Stechapparats durchdringt sie die Haut des Wirtes und zerschneidet das Gewebe der Dermis, sodass ein Blut-Lymph-Pool entsteht. Nachfolgend wird die Wunde zur Sicherung der Position der Zecke mit Speichel verfestigt. Um den ungestörten Ablauf der Blutmahlzeit zu gewährleisten enthält der Speichel Gerinnungshemmer, sowie anästhesierende und immunmodulierende Substanzen. Enzyme im Speichel sorgen für die Vorverdauung des Blut-Lymph-Gemischs, überschüssige Flüssigkeit wird direkt wieder an den Wirt abgegeben [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009].



Abbildung 2: *I. ricinus*: gesogen, weiblich, adult, Länge 15 mm, eigenes Bildmaterial

In der Frühphase des Saugaktes sind die Speicheldrüsen noch nicht vollständig ausgebildet. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Speicheldrüsen während der Blutmahlzeit können immer größere Mengen des Blut-Lymph-Gemischs aufgenom-

men werden. Eine adulte weibliche Zecke kann so ihr Gewicht um das 200-fache steigern (siehe Abbildung 2) [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009].

B.1.1.1 Verbreitung und saisonale Aktivität

Das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* erstreckt sich über ganz Europa von Portugal im Westen bis zum Ural im Osten, wo es mit dem der verwandten Art *Ixodes persulcatus* überlappt. In nordsüdlicher Richtung reicht es von Südkandinavien bis Nordafrika [European concerted action on Lyme Borreliosis, www.eucalb.com].

Innerhalb dieses Gebietes ist *I. ricinus* vor allem in Laubwäldern mit dichtem Untergrundbewuchs zu finden, insbesondere aber in fragmentierten Wäldern wo Saumbiotop², wie der Waldrand zwischen Wald und Wiese oder das Ufer von Gewässern, zahlreiche ökologische Nischen bieten [Petney et al., 2011]. Grundlagen dieses Verbreitungsmusters sind das Vorhandensein geeigneter Wirte, sowie bestimmter mikroklimatischer Bedingungen. So ist der Holzbock auf eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 80% angewiesen, weshalb das Vorliegen einer dichten feuchten Bodenschicht für sein Überleben von großer Bedeutung ist [Gray et al., 2009].

Jagdaktiv wird er erst ab Temperaturen von circa 7°C, wobei die mittlere minimale Temperatur, bei der mit der Wirtssuche begonnen wird, umso höher liegt, je kleiner die Zecke ist. Neben der Temperatur scheint die Jagdaktivität der Zecken auch mit der Tageslänge zusammenzuhängen. Längere Tage fördern dabei die Wirtssuche [Randolph, 2013].

Im Allgemeinen ist *I. ricinus* in Zentraleuropa etwa von März bis Oktober aktiv, wobei meist zwei Häufigkeitsgipfel zu beobachten sind, ein Gipfel von Frühjahr bis Frühsommer, ein zweiter im Herbst [Gray, 1998; Randolph et al., 1999; Gern, 2005; Schulz et al., 2014]. Im Sommer begrenzen höhere Temperaturen bei geringerer Luftfeuchtigkeit die Wirtssuche [Randolph et al., 2002]. Neuere Studien, welche im Südwesten Deutschlands durchgeführt wurden, erbrachten neben der beschriebenen bimodalen saisonalen Aktivität auch singuläre Aktivitätsgipfel [Schulz et al., 2014].

Das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* hat sich in den letzten Jahren verändert. So wurde in Schweden eine zunehmend nördliche Ausbreitung beobachtet, während in

²Saumbiotop (Ökoton) = Übergang zwischen zwei oder mehreren Landschafts-Ökosystemen, Lebens- oder Pflanzengemeinschaften [Spektrum.de, b]

der Tschechischen Republik und in Österreich Zecken in größerer Höhe gefunden werden konnten [Daniel et al., 2003; Holzmann et al., 2009; Jaenson et al., 2012]. Als Erklärung werden die durch den Klimawandel verbesserten Lebensbedingungen für *I. ricinus* herangezogen. Aber auch politische und sozioökonomische Handlungsweisen des Menschen üben Einfluss auf die Verbreitung von *I. ricinus* aus. Beispielsweise beeinflussen Landschaftsplanung und Jagdverhalten des Menschen die Zahl möglicher Wirte für *I. ricinus* und damit auch die Anzahl der Zecken [Randolph, 2008; Jaenson et al., 2012; Randolph, 2013].

B.1.2 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV)

B.1.2.1 Taxonomie und molekularbiologische Eigenschaften

Das FSME-Virus wird dem Genus *Flavivirus* in der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet, zu der auch andere humanpathogene Erreger wie das Hepatitis-C-Virus, das Gelbfiebertvirus und das Dengue-Virus zählen [King et al., 2011]. Neben dem in Deutschland ausschließlich vorkommenden zentraleuropäischen Subtyp des FSMEV (FSMEV-EU) sind mit dem fernöstlichen und dem russischen bzw. dem sibirischen Subtyp zwei weitere Unterarten bekannt [Ecker et al., 1999].

Flaviviren sind icosaedrische, behüllte Viren von circa 50 nm Durchmesser. Ihr annähernd 11 kb großes Genom besteht aus einer linearen Plus-Einzelstrang Ribonukleinsäure (RNA). Die genomische RNA des FSMEV trägt einen offenen Leserahmen der für drei Struktur- (C, E, M), sowie für sieben Nicht-Strukturproteine (NS 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5) kodiert. Letztere übernehmen unter anderem die Funktion von Proteasen, Helicasen und Polymerasen. Die RNA bildet zusammen mit dem Protein C (capsid) das Kapsid. Dieses wird von einer doppelten Lipidhülle, in die die Glykoproteine E (envelope) und M (membrane) eingelagert sind, umgeben. Das E-Protein stellt das Hauptantigen der spezifischen Immunabwehr infizierter Säuger dar. Es vermittelt die Zellrezeptorbindung und ist an der Fusion des viralen Partikels mit der Zellmembran beteiligt [Lindenbach & Rice, 2003]. Der offene Leserahmen des Genoms wird von zwei nicht kodierenden Regionen (NCR) flankiert. Die 3'-NCR kann in eine variable Region, die erhebliche Längenunterschiede zwischen den FSMEV-Stämmen aufweist, und eine hoch konservierte Region am terminalen 3'-Ende unterteilt werden [Wallner et al., 1995]. Die dort vorliegenden Sequenzhomologien der FSMEV-Stämme können zur Detektion von FSMEV-RNA mittels

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt werden (siehe Abschnitt C).

B.1.2.2 Transmission

Die Infektion von Menschen mit FSME erfolgt durch einen Zeckenstich über den Speichel der Zecke. Hauptvektoren sind dabei Schildzecken der Gattung *Ixodes*. Während der europäische Subtyp des FSMEV vor allem durch *I. ricinus* übertragen wird, gilt *I. persulcatus* als Hauptvektor des fernöstlichen und des sibirischen Subtyps. Sehr viel seltener ist die Ansteckung in Folge des Verzehrs nicht pasteurisierter Ziegen- bzw. Schafsmilch. Eine Transmission von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt [Süss, 2011]. Zwischen Zecken kann das Virus auf unterschiedliche Weise weitergegeben werden. Als quantitativ bedeutsamster Übertragungsweg wird das Co-feeding angesehen [Randolph et al., 1996]. Das FSMEV kann dabei zwischen zeitgleich saugenden infizierten und nicht infizierten Zecken, welche auch in einigem Abstand ($\geq 1\text{ cm}$) voneinander saugen können, übertragen werden, ohne dass eine systemische Infektion des Wirtes vorliegt [Labuda et al., 1996]. Als Vehikel für das Virus fungieren dabei Zellen des Immunsystems [Labuda et al., 1993].

Die Übertragung des Virus vom Wirt zur saugenden Zecke spielt eine geringere Rolle, da die virämische Phase bei Kleinsäugetieren, die als Hauptwirt von *Ixodes species* (*spp.*) dienen, meist nur kurz andauert [Randolph et al., 1996; Moshkin et al., 2009]. Einmal mit FSME-Viren infiziert, bleibt die Infektion bei der Reifung der Zecken über alle Entwicklungsstadien hinweg erhalten.

Zecken können das Virus zudem in geringem Umfang ($< 0,5\%$) transovariell übertragen, sodass prinzipiell alle Entwicklungsstadien infiziert sein können [Danieľová & Holubová, 1991]. Für den Menschen steht allerdings die Transmission durch Nymphen im Vordergrund, da diese in großer Zahl aktiv und zudem wenig wirtsspezifisch sind [Süss, 2003].

B.1.2.3 Epidemiologie

Das Auftreten humaner FSME-Erkrankungen ist an den Lebensraum der Vektoren gebunden. FSME-Virus tragende Zecken kommen auf der Nordhemisphäre in einem Gürtel von Europa bis Japan vor [Korenberg & Kovalevskii, 1999]. Der sibirische Subtyp ist hauptsächlich in Sibirien, aber auch in Kirgisistan zu finden, während der fernöstliche Subtyp in Russland, im Nordosten von Japan und in China nachgewie-

sen werden konnte. Der europäische Subtyp tritt in Zentral-, Nord- und Osteuropa auf [Süss, 2011]. Zudem konnte er auch in Südkorea aus Zecken und Mäusen isoliert werden [Kim et al., 2008; Süss, 2011]. Die Verbreitungsgebiete der drei Subtypen überlappen in Estland, Litauen und Finnland [Lundkvist et al., 2001; Jaaskelainen et al., 2006; Golovljova et al., 2008].

Im Gegensatz zur Verteilung von *B. burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s. l.*) ist die Verbreitzone des FSMEV nicht homogen gestaltet [Randolph et al., 2000]. Es haben sich vielmehr zahlreiche FSME-Fokusse ausgebildet, innerhalb derer das Virus zwischen Zecken, Nagern und anderen kleinen Säugetieren zirkuliert. Derartige FSME-Herde sind meist kleinräumig (circa (ca.) 2500 m^2), weshalb man sie als Mikrofokusse bezeichnet. Ausgehend vom Mikrofokus wird das Virus wahrscheinlich durch größere Säuger, wie zum Beispiel Rehe verteilt, sodass ein Makrofokus bzw. Endemiegebiete um den Mikrofokus entstehen, in denen die Gefahr einer Ansteckung mit dem FSMEV ebenfalls gegeben ist [Dobler et al., 2011].

Die Aktivität eines Fokus ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Das Virus kann nur persistieren, wenn aufgrund günstiger klimatischer Bedingungen und ausreichendem Wirtsvorkommen genügend Larven und Nymphen vorhanden sind, die zeitgleich eine Blutmahlzeit einnehmen [Randolph et al., 1996]. Auf diese Weise kann das Virus effektiv durch Co-feeding übertragen werden. Sind zu wenige Zecken vorhanden oder ist die Aktivität von Nymphen und Larven nicht synchron, so sinkt nach Randolph et. al. das Transmissionsrisiko [Randolph et al., 2000].

B.1.2.3.1 Europa

Jährlich werden in Europa zwischen 7000 und 8000 FSME-Fälle registriert, über die Hälfte hiervon in Russland [Süss, 2011]. Außerhalb Russlands waren die höchsten Inzidenzraten pro 100.000 Einwohner (Δ) von 2005-2010 in Slovenien ($\Delta = 13,1$), den baltischen Staaten ($\Delta = 10,1$) und der Tschechische Republik ($\Delta = 6,8$) verzeichnet worden. Die genaue Erfassung der FSME-Inzidenz in Europa ist jedoch schwierig. Auch wenn in vielen europäischen Ländern die Überwachung menschlicher FSME-Erkrankungen etabliert ist, unterscheiden sich Meldesysteme und Falldefinitionen zum Teil erheblich voneinander [European Centre for Disease Prevention & Control., 2012].

B.1.2.3.2 Deutschland

In Deutschland besteht seit 2001 gemäß §7 Abs. 1 Nr. 14 des Infektionsschutzgesetzes eine namentliche Meldepflicht bei direktem oder indirektem Nachweis des FSME-Virus. Informationen über die vor Einführung der Meldepflicht aufgetretenen, humane FSMEV-Infektionen stammen vornehmlich aus wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Auf Grundlage der erhobenen Daten nimmt das Robert Koch-Institut (RKI) jedes Jahr eine Einschätzung des kreisbezogenen Erkrankungsrisikos vor. Berücksichtigt werden hierbei nur Fälle bei denen über den Virusnachweis hinaus klinisch das Bild einer FSME besteht [Robert Koch-Institut, 2007b].

Nach Definition des RKI gilt ein Kreis als FSME-Risikogebiet, *“wenn die Anzahl der übermittelten FSME-Erkrankungen in mindestens einem der Zeiträume 2002 bis 2006, 2003 bis 2007, 2004 bis 2008, 2005 bis 2009, 2006 bis 2010 oder 2007 bis 2011 im Kreis ODER in der Kreisregion (bestehend aus dem betreffenden Kreis plus allen angrenzenden Kreisen) signifikant ($p < 0,05$) höher liegt als die bei einer Inzidenz von 1 Erkrankung / 100.000 Einwohner erwartete Fallzahl”* [Robert Koch-Institut, 2012].

Risikogebiete liegen vor allem in Baden-Württemberg und Bayern. Fernerhin ist die Frühsommer-Meningoenzephalitis in mehreren Landkreisen in Hessen und Thüringen, sowie dem Landkreis Birkenfeld in Rheinland-Pfalz endemisch. Der Saarpfalz-Kreis im Saarland wurde 2012 als Risikogebiet eingestuft.

Seit 2001 wurden ca. 3500 FSME-Fälle in Deutschland gemeldet, was einer Inzidenz von 0,31 pro 100.000 Einwohner entspricht [Robert Koch-Institut, SurvStat@RKI]. Die Fallzahlen waren von 2001 bis 2011 mit etwa 200 bis 300 Fällen pro Jahr weitgehend stabil. Eine Ausnahme bildet die Häufung der FSME-Erkrankungen mit 432 bzw. 546 Fällen in den Jahren 2005 und 2006 [Robert Koch-Institut, 2012]. Dieser Anstieg war in zahlreichen europäischen Ländern zu beobachten. Er wird vor allem auf eine vermehrte Aktivität im Freien bei guten Wetterbedingungen und damit auf ein höheres Expositionsrisiko zurückgeführt [Randolph et al., 2008]. 2011 wurden mit 423 Fällen ebenfalls im Vergleich zum Vorjahr deutlich mehr Erkrankungsfälle registriert, davon 409 in Deutschland erworbene Infektionen. Über 90% der gemeldeten Fälle waren in Baden-Württemberg oder Bayern aufgetreten. Der Anteil der gegen FSME durch eine Impfung immunisierten Bevölkerung in Kreisen mit einer

Bundesland	Sammelort	Jahr der Sammlung	Prävalenz [%] (absolut)	Anzahl unter-suchter Zecken	Referenz
Mecklenburg-Vorpommern		2006	0	G : 651 A : 41 N : 542 L : 68	[Klaus et al., 2010a]
Sachsen-Anhalt	Colbitz-Letzlinger Heide und Umgebung	2005 / 2006	0	G : 2202 A : 371 N : 1451 L : 380	
Thüringen	Hainich National Park	2006	0	G : 888 A : 457 N : 420 L : 11	
	Saale-Holzland-Kreis, Jena	2008 - 2010	0	G : 1557 A : 283 N : 917 L : 357	[Klaus et al., 2013]
Baden-Württemberg	nahe Freiburg	1997 - 2002	G : 0,15–3,4 A : 0–4,8 N : 0–3,4	G : 10.520 A : 1600 N : 8920	[Stüss et al., 2004]
		1998 - 2000	G : 0–2,3	G : 9189	[Oehme et al., 2002]
	Bodenseekreis (Salem, Affenberg)	2008	0	G : 294 A : 38 N : 256	[Klaus et al., 2010c]
	Emmendingen	2008	0	G : 526 A : 70 N : 358 L : 98	[Klaus et al., 2012]
	Ortenaukreis	2008	G^g : 0,08 (1)	G : 1174 A : 167 N : 1007	
Hessen	Marburg-Biedenkopf	2000	0	G : 1010 A : 310 N : 700	[Stüss et al., 2002]
Rheinland-Pfalz	Birkenfeld	2000	0	G : 998 A : 78 N : 920	
Bayern	Nahe Passau	1997-2002	G : 0–2 A : 0–5,3 N : 0–1,4	G : 11.190 A : 1750 N : 9440	[Stüss et al., 2004]
	München, Dachau, Passau, Rosenheim, Amberg	2006 / 2007	G : 0,44	G : 3430 A : 1465 N : 1965	[Kupca, 2009]

Tabelle 1: Übersicht zwischen 1997 - 2010 mittels PCR durchgeführter Studien zur Prävalenz von FSMEV in wirtssuchenden nüchternen *I. ricinus* in Deutschland (A = Adulte; N = Nymphen; L = Larven; G = Gesamt, ^g Gesamtprävalenz errechnet)

Fünffjahresinzidenz von über fünfzehn Erkrankungen pro 100.000 Einwohner lag bei 40,2% im Zeitraum von 2007 bis 2011 [Robert Koch-Institut, 2012].

Erkrankungen die auf den Verzehr infizierter Rohmilchprodukte zurückgehen, wurden seit mehr als zwanzig Jahren nicht berichtet [Süss et al., 2004]. Somit stellt die Infektion durch einen Zeckenstich in Deutschland den Hauptübertragungsweg dar. Nicht zuletzt aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren in Deutschland mehrere Untersuchungen zur Prävalenz des FSMEV in Zecken durchgeführt. Eine Übersicht einiger Studien mit vergleichbarer Methodik bietet Tabelle 1.

B.1.2.3.3 Rheinland-Pfalz

Von 2001 bis 2011 wurden siebzehn Fälle mit definitivem Infektionsort in Rheinland-Pfalz gemeldet (siehe Abbildung 3).

Neun davon wurden im Landkreis (LK) Birkenfeld registriert [Robert Koch-Institut, 2012]. Dieser gilt seit 2001 als Risikogebiet, da dort im Raum Idar-Oberstein zwischen 1997 und 2001 insgesamt sieben Erkrankungsfälle aufgetreten waren [Zollner et al., 1998; Woessner et al., 2000; Robert Koch-Institut, 2001; Woessner et al., 2001b; Pietsch et al., 2002]. Der erste autochthone Fall einer FSME nach vorausgegangenem Zeckenstich im Gebiet von Idar-Oberstein wurde 1992 dokumentiert [Zollner et al., 1998]. Nachfolgend wurden bis 1997 keine weiteren FSMEV-Infektionen beschrieben. Im Mai des Jahres 2000 erfolgte die Bestimmung der Virusprävalenz in *I. ricinus* an möglichen Infektionsorten der Patienten in Idar-Oberstein (Struth-Neuweg, Mittelbollenbach, Waldschänke). Dabei konnten in den gesammelten 78 adulten Zecken und 920 Nymphen keine FSMEV-spezifischen Nukleinsäuren nachgewiesen werden [Süss et al., 2002; Pietsch et al., 2002]. Zur Einschätzung des landesweiten Auftretens autochthoner FSME-Erkrankungen wurden 2001 Serum bzw. Liquorproben von 163 Patienten mit viraler Meningitis immunologisch untersucht. Hierbei konnte keine akute Infektion mit FSME-Viren und damit auch kein Hinweis auf weitere FSME-Fokusse gefunden werden [Pietsch et al., 2002].

Eine besondere Stellung besitzen die Landkreise Alzey-Worms, Germersheim, der Rhein-Pfalz-Kreis sowie die Stadtkreise Speyer und Worms. Betrachtet man die zugehörigen Kreisregionen, so weisen diese eine nach den Kriterien des RKI signifikant erhöhte Anzahl an FSME-Neuerkrankungen auf, die einen Status als Risikogebiet rechtfertigen würden. Allerdings gab es in diesen Kreisen nie Erkrankungsfälle mit

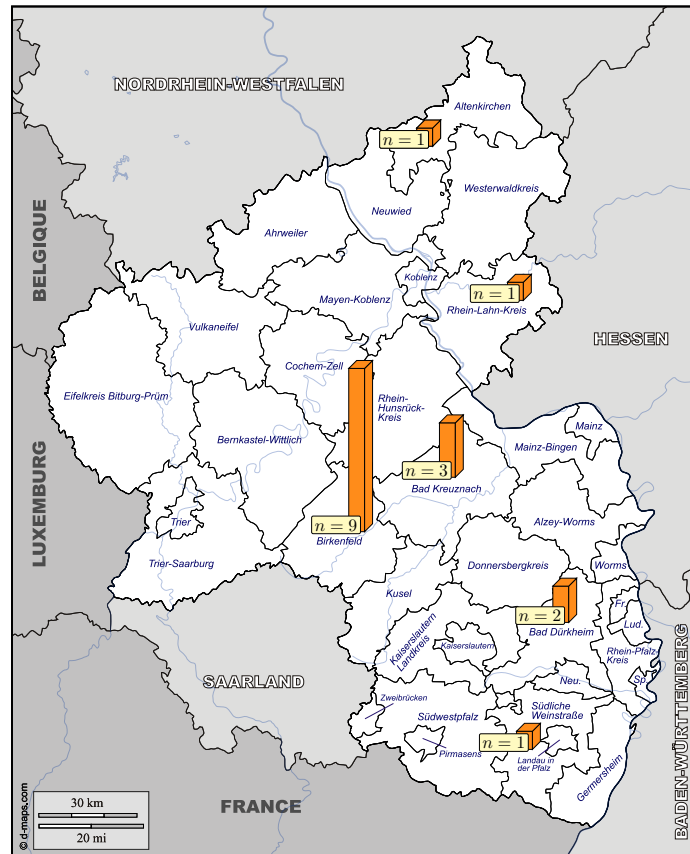


Abbildung 3: Anzahl n der FSME-Erkrankungsfälle von 2001 bis 2011 mit definitivem Infektionsort in Rheinland-Pfalz nach Landkreisen (Daten: Epidemiologisches Bulletin 21 [Robert Koch-Institut, 2012]; Karten: http://d-maps.com/carte.php?num_car=6373&lang=de, http://d-maps.com/carte.php?num_car=6385&lang=de, http://d-maps.com/carte.php?num_car=24007&lang=de)

autochthonem Charakter, als Infektionsort wurden jeweils die angrenzenden Risikogebiete Hessen und Baden-Württemberg angesehen. Da die genannten Kreise von diesen beiden Risikogebieten durch den Rhein als plausible natürliche Grenze getrennt sind, wurden sie selbst bisher nicht zu Risikogebieten erklärt [Robert Koch-Institut, 2012].

B.1.2.3.4 Saarland

Der an Rheinland-Pfalz angrenzende Saarpfalz-Kreis wurde 2011 als einziger Kreis im Saarland als Risikogebiet eingestuft. Es waren dort 2008 drei FSME-Fälle nach

einem Zeckenstich im Raum St. Ingbert-Rohrbach innerhalb von zwei Monaten aufgetreten [Robert Koch-Institut, 2008b]. Nachdem in den Folgejahren 2009 und 2011 jeweils ein Fall registriert wurde, lag die Fünfjahresinzidenz im Zeitraum von 2007 bis 2011 signifikant über der vom Robert Koch-Institut festgelegten Grenze [Robert Koch-Institut, 2012]. Eine im August 2008 durchgeführte Untersuchung von 2035 Zecken von verschiedenen Standorten im Saarland, unter anderem vom Glashütter Weiher in Rohrbach und aus Gonneseweiler in Nähe des Bostalstausees, ergab keinen positiven Befund [Süss, 2008; Robert Koch-Institut, 2009b].

Vor 2008 war nur ein weiterer autochthoner Fall im Saarland bekannt geworden. Es handelte sich dabei um einen 67-jährigen Mann bei dem im Juli 1994 klinisch-serologisch eine akute FSMEV-Infektion nachgewiesen wurde [Treib, 1994]. Die Infektion mit dem FSMEV war nach Angabe des Autors vermutlich im Raum Saarlouis erworben worden. Diese Annahme wurde durch den genomischen Nachweis von FSMEV-RNA in *I. ricinus* aus der Region Saarlouis / Überherrn gestützt [Süss et al., 1996]. Dieser Virusnachweis ist Teil einer von Süss et al. 1995 durchgeführten Studie, bei der fast 9000 Zecken aus allen Regionen des Saarlandes in 21 Pools untersucht wurden. Neben dem bereits genannten positiven Pool aus Saarlouis / Überherrn zeigte eine gepoolte Probe aus Perl / Mettlach / Schwemmlingen ein positives Ergebnis [Süss et al., 1996].

Vor 1994 galt das Saarland als frei von FSME, nicht zuletzt da in einer Seroprävalenzstudie 1985/86 bei 408 Forstarbeitern, 439 zeckenexponierten Tieren (vor allem Rinder) und 44 Patienten mit Verdacht auf eine virale Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS) lediglich bei acht geimpften Forstarbeitern der Nachweis von FSMEV-Antikörpern gelang [Müller & Ansorg, 1987].

Zur besseren Einschätzung des Auftretens von FSME-Erkrankungen im Saarland bis einschließlich 1994 wurden daher ca. 2000 serologische FSME-Untersuchungen und 904 Serumproben von Patienten mit entzündlichen Liquorveränderungen, die im Zeitraum von 1989 bis 1994 am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg / Saar behandelt wurden, retrospektiv auf das Vorliegen von FSMEV-Antikörpern untersucht. Dabei konnte der oben beschriebene autochthone Fall von 1994 bestätigt werden. Eine weitere FSMEV- Infektion wurde im Mai des selben Jahres vermutlich im Raum Saarbrücken erworben. Allerdings hielt sich der Patient im Inkubationszeitraum auch kurzzeitig in Straßburg auf, sodass der Infektionsort nicht endgültig festgelegt werden konnte. Bei zwei weiteren Patienten fand sich serologisch der Hin-

weis auf einen Viruskontakt im Saarland, welcher jedoch nicht zu einer manifesten Erkrankung führte [Treib et al., 1996].

B.1.2.4 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention

Die FSME tritt in Europa entsprechend der saisonalen Zeckenaktivität in Abhängigkeit der Witterungsbedingungen von März bis November auf [Dautel et al., 2008]. Etwa 10 – 30% der mit FSMEV-EU infizierten Patienten zeigen nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 7 – 10 Tagen Symptome. In etwa drei Viertel der Fälle verläuft die Erkrankung biphasisch. Im Stadium der Virämie kommt es zum plötzlichen Fieberanstieg bis 39°C mit unspezifischen Beschwerden wie Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Müdigkeit und einem allgemeinen Schwächegefühl. Nach einem fieberfreien Intervall von einigen Tagen befällt das FSMEV bei einem Drittel der Patienten das zentrale Nervensystem (ZNS). Die ZNS-Beteiligung manifestiert sich in Form einer Meningitis (50%), Enzephalitis (40%) oder einer begleitenden Myelitis (10%) mit jeweils hohem Fieber bis 40°C. Die Meningitis geht einher mit Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit und starker Übelkeit. Besteht zudem eine Enzephalitis, so stehen fokale neurologische Herdsymptome mit Vigilanzminderung im Vordergrund. Die Meningoenzephalomyelitis als schwerste Verlaufsform der FSME wird charakterisiert durch schlaffe Paresen, die meist obere Extremität, Schultergürtel-, Hals- und Nackenmuskulatur betreffen. Bei Beteiligung von Atemmuskulatur bzw. Zwerchfell ist eine lebensbedrohliche Atemlähmung möglich [Kaiser, 2012]. Je nach Verlaufsform und Intensität der akuten Symptomatik behält ein Teil der Patienten Folgeschäden zurück. In der Mehrzahl der Fälle heilt die symptomatische FSMEV-Infektion jedoch folgenlos aus [Haglund et al., 1996; Kaiser, 1999].

Nach Ablauf einer akuten Enzephalitis weisen 35 – 58% der Patienten ein postenzephalitisches Syndrom mit meist neuropsychiatrischen Beschwerden z.B. Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen auf. Patienten, die zusätzlich eine Myelitis entwickeln, haben die schlechteste Langzeitprognose. In einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von 10 Jahren zum klinischen Verlauf der primär myelitischen Form der FSME, kam es nur bei 19% der Patienten zur restitutio at integrum. Bei etwa der Hälfte der Patienten blieben neurologische Defizite vor allem in Form von Paresen bestehen. 30% der Patienten starben [Kaiser, 2011].

Dem gegenüber steht eine allgemeine Letalität symptomatischer FSMEV-Infek-

tionen von etwa 1 – 2% [Burke & Monath, 2001].

Die Variabilität der Krankheitsverläufe liegt unter anderem in Unterschieden der individuellen Immunabwehr und der Pathogenität der viralen Stämme begründet [Maximova et al., 2009; Gäumann et al., 2011]. Schwere Krankheitsverläufe und hohe Defizitraten sind mit höherem Alter assoziiert [Haglund et al., 1996]. Eine kausale Therapie der Frühsommer-Meningoenzephalitis existiert nicht. Es besteht jedoch die Möglichkeit der Immunprophylaxe mit Hilfe eines polyvalenten Impfstoffs. Die Impfstoffe sind im Allgemeinen gut verträglich und mit einer Impfeffektivität von über 99% bei Einhaltung der empfohlenen Impfschemata in allen Altersgruppen sehr erfolgreich [Demicheli et al., 2009; Heinz et al., 2007]. Eine Impfung wird derzeit in Deutschland von der ständigen Impfkommission des RKI für Personen mit erhöhtem Expositionsrisiko in FSME-Risikogebieten durch Beruf oder Freizeitgestaltung empfohlen [Robert Koch-Institut, 2015].

B.1.3 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

B.1.3.1 Taxonomie, Morphologie und Genom

Der *B. burgdorferi sensu lato* Komplex gehört zur Familie der *Spirochaetaceae*. Er umfasst bislang achtzehn Genospezies, wovon fünf als sicher humanpathogen gelten. Dabei handelt es sich um *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*. Drei weitere Spezies, *B. bissettii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* wurden bisher nur selten als Verursacher einer Lyme-Borreliose in Patienten nachgewiesen [Ogden et al., 2013].

Borrelien sind etwa $0,2 - 0,5 \mu\text{m}$ breite und $5 - 25 \mu\text{m}$ lange gramnegative Bakterien. Ihre spiralförmige Form ermöglicht ihnen zusammen mit bis zu dreißig Flagellen die Fortbewegung [Darai et al., 2012]. Sie besitzen ein lineares Chromosom, sowie eine Vielzahl linearer und zirkulärer Plasmide. Die Mehrzahl ihrer metabolischen Enzyme wird chromosomal kodiert, während die Plasmide unter anderem Gene für Oberflächenproteine tragen. Den Plasmiden wird eine wichtige Rolle bei der Infektion von Wirten zugeschrieben [Casjens et al., 2010].

B.1.3.2 Transmission, Vektoren und Erregerreservoir

Hauptvektor der Lyme-Borreliose sind Schildzecken der Gattung *Ixodes*. In Europa erfolgt die Übertragung von Borrelien auf den Menschen in erster Linie durch

I. ricinus, in geringerem Maße auch durch *I. persulcatus* [Lindgren et al., 2006].

Die Borrelien befinden sich im Mitteldarm infizierter Zecken. Beim Saugakt vermehren sie sich und gelangen nach Invasion der Speicheldrüsen über den Speichel in den Wirt. Da dieser Prozess einige Zeit in Anspruch nimmt, findet die Übertragung von Borrelien erst Stunden nach Beginn der Blutmahlzeit statt [Crippa et al., 2002].

Zecken selbst nehmen die Erreger meist über das Blut eines infizierten Reservoirwirtes auf, seltener durch Co-feeding. Hierbei stellt die Haut der Wirtstiere die Schnittstelle zur Infektionsübertragung dar, da Borrelien sich, auf ihre eigene Mobilität angewiesen, nur langsam ausbreiten können. Die Infektion der Zecke bleibt transstadial erhalten. Eine transovarielle Transmission ist die Ausnahme [Randolph et al., 1996; Lindgren et al., 2006].

Als Erregerreservoir werden kleine Nagetiere und einige Vögel angesehen. Hirsche stellen keine kompetenten Wirte dar, sind allerdings zur Erhaltung der Zeckenpopulation und somit auch des Transmissionszyklus unverzichtbar, da sie adulten Zecken als Nahrungsquelle dienen [Stanek et al., 2012]. Außerdem wird eine mögliche Rolle der Hirsche bei der Übertragung der Borrelien durch Co-feeding diskutiert [Voor-douw, 2015].

B.1.3.3 Epidemiologie

Das Verbreitungsgebiet der Borrelien stimmt mit dem ihrer Hauptvektoren überein [Lindgren et al., 2006]. Alle der genannten, gesichert humanpathogenen Spezies kommen in Europa und auch innerhalb Deutschlands vor, während in den USA bisher nur Stämme der humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi sensu stricto* nachgewiesen wurden [Fingerle et al., 2008; Piesman & Schwan, 2010; Ogden et al., 2013]. Die meisten in Europa auftretenden Lyme-Borreliose Fälle werden durch *B. garinii* verursacht, gefolgt von *B. afzelii* [Stanek et al., 2012].

Einer Metaanalyse von Rauter und Hartung zufolge sind im Mittel 10,1% der Nymphen und 18,6% der adulten Zecken in Europa mit Borrelien infiziert [Rauter & Hartung, 2005]. Für Deutschland allein gelten vergleichbare Werte (siehe Tabelle 2). In der Folge entwickeln abhängig von der regionalen Borrelienprävalenz in *I. ricinus* nach einem Zeckenstich etwa 2 – 4% der Betroffenen manifeste Symptome einer Borreliose [Hubálek, Z. , 2009].

Die Anzahl der Neuerkrankungen in Europa kann lediglich geschätzt werden,

Region	Bundesland	Jahr der Sammlung	Prävalenz [%]	Anzahl untersuchter Zecken	Referenz
Norden	Mecklenburg-Vorpommern	2008	3,1	512	[Franke et al., 2011]
	Berlin	2003	30,19 ^c	127 ^a	[Pichon et al., 2006]
Mittel-deutsch-land	Thüringen	1999 2000	11,1	305	[Hildebrandt et al., 2003]
	Thüringen / Reifenstein	2004	15,2	256	[Kipp et al., 2006]
		2007	5,1	196	[Franke et al., 2010]
	Thüringen	2006 2007	27	1000	[Hildebrandt et al., 2010b]
	Hessen	2009 2010	9,5	3615	[Bingsohn et al., 2013]
Westen	Nordrhein- Westfalen / Bonn	1996 1999	18,1	226 ^b	[Kurtenbach et al., 2001]
		2001	14	545	[Kampen et al., 2004]
		2003	17,9	1394	[Maetzel et al., 2005]
Südwesten	unbekannt	1997 - 2001	16	3665	[Schaarschmidt et al., 2001]
Süden	Bayern / München	2007	22	2155	[Fingerle et al., 2008]
	Baden- Württemberg	1998 - 2000	13,9 - 24	3138	[Oehme et al., 2002]

Tabelle 2: Übersicht zwischen 1996-2010 mittels PCR durchgeführter Studien zur Prävalenz von *B. burgdorferi sensu lato* in wirtssuchenden nüchternen *I. ricinus* in Deutschland (*a* = nur Nymphen; *b* = nur Adulte; *c* = Gesamtprävalenz errechnet)

da nur wenige Länder über ein Meldesystem verfügen. Lindgren et al. gehen von über 200.000 Neuerkrankungen pro Jahr aus [Lindgren et al., 2006]. In Deutschland können ebenfalls keine genauen Angaben zur bundesweiten Inzidenz gemacht werden, da die Erkrankung an einer Borreliose nach dem Infektionsschutzgesetz nicht bundesweit meldepflichtig ist. Allerdings gilt eine erweiterte Meldepflicht auf Basis von Landesverordnungen in neun der sechzehn Bundesländer und zwar in Bayern, Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Rheinland-Pfalz und im Saarland. Erfasst werden dabei nach Falldefinition des Robert Koch-Instituts nur akute Neuerkrankungen [Robert Koch-Institut, 2009a]. Die Meldepflicht im Saarland und in Rheinland-Pfalz wurde erst 2011, die in Bayern 2013 eingeführt. Ein Vergleich zwischen regionalen Prävalenzen ist daher schwierig. Die jährliche Inzidenz in den verbleibenden sechs östlichen Bundesländern stieg zunächst nach Einführung der Meldepflicht in den neunziger Jahren bis 2008 kontinuierlich an. 2008 lag sie bei 33,8 Meldefällen pro 100.000 Einwohner [Robert Koch-Institut, 2010]. Im Zeitraum von 2009 - 2012 schien sich die Zahl der gemeldeten Neuerkrankungen zu stabilisieren [Wilking & Stark, 2014].

Weitere Anhaltspunkte zur Borrelienprävalenz in Menschen liefert eine zwischen 2008 und 2011 deutschlandweit durchgeführte Seroprävalenzstudie mit fast 7000 Teilnehmern, welche eine gesamtdeutsche mittlere Prävalenz von 9,4% erbrachte. Dabei wurde die höchste Seroprävalenzrate von 11,2% im Süden Deutschlands, welchem neben Bayern und Baden-Württemberg auch das Saarland und Rheinland-Pfalz zugeordnet wurden, nachgewiesen. Die niedrigste Prävalenz lag mit 8,1% in Zentraldeutschland vor [Wilking et al., 2015].

B.1.3.4 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung mit großer Symptomvariabilität. Je nach Genospezies sind insbesondere Haut, Gelenke und das Nervensystem, seltener auch Herz und Auge betroffen. *B. garinii* gilt als überwiegend neurotrop, während *B. burgdorferi sensu stricto* eher für Arthritiden großer Gelenke (Lyme-Arthritis) verantwortlich gemacht wird. Bei einer Infektion mit *B. afzelii* stehen Affektionen der Haut im Vordergrund [Stanek et al., 2012]. Die Klinik der Borreliose wird in Früh- und Spätmanifestationen eingeteilt, wobei keine zeitliche Grenze zwischen den Stadien existiert. Ein Frühstadium muss nicht zwingend durchlaufen

werden.

Typische **Hautmanifestation** in der Frühphase der Lyme-Borreliose ist das, etwa ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich auftretende, *Erythema migrans* (Wanderröte). Dabei handelt es sich um eine den Zeckenstich umgebende Rötung, gegebenenfalls mit zentraler Abblassung, die sich zentrifugal entsprechend der Wanderungsbewegung der Borrelien ausbreitet [Stanek et al., 2011].

Ein solches *Erythema migrans* wird bei über 80% der Borreliose-Patienten in Deutschland beobachtet, wobei es häufig das einzige Symptom der Infektion bleibt [Huppertz et al., 1999; Wilking & Stark, 2014]. Es verschwindet von selbst, kann aber über mehrere Monate persistieren. Sein Auftreten ist nicht an eine Infektion mit einer bestimmten Genospezies gebunden.

Weitaus seltener ist die *Lymphadenosis cutis benigna*, eine umschriebene Schwellung und Verfärbung der Haut durch lymphozytäre Infiltrate, welche besonders im Gesicht, an den Ohrläppchen und Mamillen auftritt. Als späte pathologische Hautveränderung kann es bei Erwachsenen zur *Acrodermatitis chronica atrophicans* kommen, welche zu irreversibel atrophierter sklerosierter Haut der Extremitätenstreckseiten führt [Stanek et al., 2011].

Charakteristisch für die frühe **Neuroborreliose** im Erwachsenenalter sind äußerst schmerzhafte Meningoradikuloneuritiden (Bannwarth-Syndrom) sowie ein- oder beidseitige periphere Fazialisparesen. Bei Kindern stehen neben Hirnervenlähmungen lymphozytäre Meningitiden im Vordergrund.

Die seltenen isolierten Polyneuropathien können sowohl zu Beginn der Erkrankung, als auch als Spätmanifestationen auftreten. Zudem können sich im chronischen Stadium einer Neuroborreliose (Symptome ≥ 6 Monate) progrediente Enzephalomyelitiden, Radikulomyelitiden und chronischen Meningitiden entwickeln [Stanek et al., 2011].

Die häufigste Manifestationsform einer späten Borreliose in Deutschland stellt die **Lyme-Arthritis**, welche meist als Mono- oder Oligoarthritis in Erscheinung tritt, dar.

Eine **antibiotische Therapie** ist in der Frühphase der Infektion am erfolgreichsten. In frühen Stadien werden Tetracykline wie zum Beispiel Doxycyclin eingesetzt. In fortgeschrittenen Stadien gelten vor allem Cephalosporine der III. Generation als Mittel der Wahl [Stanek et al., 2012]. Objektivierbare Spätschäden nach vorausge-

gangener Borreliose treten nur vereinzelt auf [Stanek et al., 2011].

Eine aktive Immunisierung ist in Europa aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Genospezies zurzeit nicht verfügbar [Schuijt et al., 2011]. Bisher wurden zwei OspA-Impfstoffe (LYMERix und ImuLyme) entwickelt, welche nur vor *B. burgdorferi sensu stricto* schützen und somit für Endemiegebiete außerhalb Nordamerikas nur von geringem Nutzen sind. Allerdings wurde LYMERix vom Hersteller 2002 wegen sinkender Absatzzahlen vom Markt genommen. Für ImuLyme wurde nie eine Zulassung beantragt [Nigrovic & Thompson, 2007].

B.1.4 *Anaplasma phagocytophilum*

B.1.4.1 Taxonomie und Morphologie

Anaplasma phagocytophilum ist ein unbewegliches, pleomorphes gramnegatives Bakterium mit einer Größe von $0,4 - 1,3 \mu\text{m}$ [Rikihisa, 2011]. Es wird dem Genus *Anaplasma* innerhalb der Familie der *Anaplasmataceae* zugeordnet (Tabelle 3).

Genus	<i>Aegyptianella</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Ehrlichia</i>	<i>Neorickettsia</i>	<i>Wolbachia</i>
Spezies	<i>A. pallorum</i>	<i>A. bovis</i>	<i>E. canis</i>	<i>N. helminthoeca</i>	<i>W. pipientis</i>
		<i>A. marginale</i>	<i>E. chaffeensis</i>	<i>N. sennetsu</i>	
		<i>A. ovis</i>	<i>E. ewingii</i>	<i>N. risticii</i>	
		<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. muris</i>		
		<i>A. platys</i>	<i>E. ruminantium</i>		

Tabelle 3: Familie der *Anaplasmataceae* modifiziert nach Rikihisia (2011); gesichert humanpathogene Erreger sind orange unterlegt

Im Zuge der Revision der Taxonomie dieser Familie 2001 wurden die zuvor einzeln aufgeführten Species *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophilum* und das *Humane granulozytäre Ehrlichiose-Agens* zur Art *A. phagocytophilum* zusammengefasst [Dumler et al., 2001]. Basierend auf Sequenzanalysen können allerdings innerhalb dieser Art weitere Subspecies abgegrenzt werden. So scheinen für die Infektion von Menschen, Hunden und Pferden andere genetische Varianten verantwortlich zu sein, als zum Beispiel in erkrankten Kühen und Schafen gefunden wurden [Scharf et al., 2011; Huhn et al., 2014]. Inwieweit eine Wirtsadaptation einzelner Stämme erfolgt und welche pathogenetische Bedeutung hieraus resultiert, ist gegenwärtig Objekt der Forschung. Aus dem Blut erkrankter Menschen wurde bisher neben dem

Prototyp-Stamm (Ap-ha) der ersten beschriebenen humanen granulozytären Anaplasiose weitere Varianten isoliert, wobei Isolate aus den Vereinigten Staaten hochgradige Übereinstimmungsraten mit europäischen Stämmen aufweisen [Chen et al., 1994; Foley et al., 1999; Scharf et al., 2011; Huhn et al., 2014].

Der Aufbau der Zellwand der Anaplasmen unterscheidet sich von dem anderer gramnegativer Bakterien. Sie besitzen keine Peptidoglykane und auch keine Lipopolysaccharide an der Zelloberfläche [Stuen et al., 2013]. Stattdessen gewährleistet vom Wirt stammendes Cholesterin die Stabilität ihrer Zellwand [Lin & Rikihisa, 2003]. Entsprechend gering ist die Resistenz der Anaplasmen gegenüber äußeren Einflüssen, wie mechanischer Beanspruchung oder Änderungen der Osmolarität [Lin & Rikihisa, 2003].

B.1.4.2 Genom

Das Genom von *A. phagocytophilum* besteht aus einem singulären, zirkulären Chromosom mit einer Länge von etwa 1,5 Mb. Es enthält zahlreiche repetitive Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Sequenzen. So sind funktionell wichtige Gene, beispielsweise der Vitamin- und Kofaktor-Biosynthese, zweifach vorhanden. Außerdem umfasst es über hundert paraloge msp2 Gene (major surface protein 2), die für Oberflächenproteine kodieren. Diese stellen, aufgrund ihrer exponierten Lage auf der Zelloberfläche, die Hauptantigene von *A. phagocytophilum* dar [Dunning Hotopp et al., 2006].

B.1.4.3 Transmission, Vektoren und Erregerreservoir

Die Übertragung von *A. phagocytophilum* auf den Menschen erfolgt in erster Linie durch den Stich infizierter Zecken. In Europa gilt *I. ricinus* als Hauptvektor, in den USA dagegen *I. scapularis* und *I. pacificus*. In Osteuropa und Ostasien dient *I. persulcatus* als Überträger [Huhn et al., 2014]. Eine Ansteckung durch Kontakt mit infektiösem Blut ist sehr selten [Bakken et al., 1996; Horowitz et al., 1998b; Zhang et al., 2008]. Von besonderer Bedeutung ist dieser Transmissionsweg in der Transfusionsmedizin. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Fälle einer humanen Anaplasiose berichtet, die wahrscheinlich auf den Erhalt von Thrombozytenkonzentraten zurückgehen, obschon es sich bei letzteren um leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate handelte [Townsend et al., 2014]. Somit bergen auch Erythrozytenkonzentrate das Risiko einer Infektion [Jereb et al., 2012].

Zecken nehmen die Erreger bei der Blutmahlzeit von einem infizierten Wirt auf. In der Folge wird *A. phagocytophilum* transstadiell, nicht aber transovariell weitergegeben [Dunning Hotopp et al., 2006].

Das Wirtsspektrum der Anaplasmen ist breit. So wurde *A. phagocytophilum* aus zahlreichen Säugetieren isoliert, darunter Schafe, Ziegen, Kühe, Rehe, Nager und auch aus Haustieren wie Hunden und Katzen.

Als Reservoir für humanpathogene Varianten in Europa werden größere Säugetiere, wie Wildschweine, sowie Kleinsäuger wie zum Beispiel Igel in Betracht gezogen [Huhn et al., 2014]. Die Rolle von Rehen, Wühl- und Spitzmäusen als Reservoirwirte wird durch Gensequenzanalysen in Frage gestellt [Scharf et al., 2011; Huhn et al., 2014].

B.1.4.4 Epidemiologie

Beim Menschen verursacht *A. phagocytophilum* die humane granulozytäre Anaplas-mose (HGA), welche vor Revision der Taxonomie als humane granulozytäre Ehrli-chiose bezeichnet wurde [Dumler et al., 2001]. Infektionen mit *A. phagocytophilum* kommen innerhalb des Verbreitungsgebiets der Hauptvektoren in den Vereinigten Staaten, in Europa und in Asien (China, Sibirien und Korea) vor [Jin et al., 2012].

Der erste Fall einer HGA war 1990 im US-Bundesstaat Wisconsin aufgetre-ten [Chen et al., 1994]. Aktuell steht die HGA in den Vereinigten Staaten an zweiter Stelle der zeckenübertragenen Erkrankungen. Seit Einführung der landesweiten Meldepflicht 2000 ist die Anzahl der Neuerkrankungen dort stetig gestiegen auf nunmehr $8,1/10^6$ Einwohner 2010. Fast 90% der gemeldeten Fälle entfallen dabei auf sechs Staaten im Norden bzw. Nordosten des Landes [CDC: www.cdc.gov].

Vergleichsweise gering erscheinen die europäischen Fallzahlen der HGA. Seit ihrer Erstbeschreibung in Europa 1997 in Slowenien sind etwa siebzig molekularbiologisch bestätigte Erkrankungen bekannt geworden [Petrovec et al., 1997; Dumler et al., 2005].

In Deutschland wurde im Gegensatz zu den umliegenden Nachbarstaaten Öster-reich, Polen und den Niederlanden bislang kein manifester Fall einer HGA doku-mentiert [Bakken & Dumler, 2006]. Dennoch spricht das Vorliegen von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* bei 1,0 – 4,4% der Normalbevölkerung und bei bis zu 14% der untersuchten Risikopopulationen (Waldarbeiter, Borreliose-Patienten) für

Region	Bundesland	Jahr der Sammlung	Prävalenz [%]	Anzahl untersuchter Zecken	Referenz
Norden	Mecklenburg-Vorpommern	2008	1	293	[Franke et al., 2011]
	Berlin	2003	3,9	127 ^a	[Pichon et al., 2006]
	Niedersachsen	2005	3,2	1646	[Schicht et al., 2011]
Mittel-deutsch-land	Sachsen	2009	8,7	539	[Silaghi et al., 2012]
	Thüringen	1999 - 2000	2,3	305	[Hildebrandt et al., 2003]
		2006 - 2007	5,4	1000	[Hildebrandt et al., 2010a]
		2007	0	196	[Hildebrandt et al., 2011]
Südwesten	Saarland	2008	17,4	115	[Silaghi et al., 2012]
Süden	Baden-Württemberg	1998 - 2000	2,8 ^b	1963	[Oehme et al., 2002]
		1999 - 2001	1,0	5424	[Hartelt et al., 2004]
	Bayern	1997	1,6	492	[Fingerle et al., 1999]
		2006	2,9	2862	[Silaghi et al., 2008]
		2009	9,4	128	[Silaghi et al., 2012]
		2009 - 2010	9 ^b	5569	[Schorn et al., 2011]
		2011 - 2012	5,3 ^b	4064	[Overzier et al., 2013]

Tabelle 4: Übersicht zwischen 1997-2012 mittels PCR durchgeführter Studien zur Prävalenz von *A. phagocytophilum* in wirtssuchenden *I. ricinus* in Deutschland (*a* = nur Nymphen; *b* = Gesamtprävalenz errechnet)

die Existenz von Infektionen mit diesem Pathogen in Deutschland [Fingerle et al., 1997; von Wissmann et al., 2015].

A. phagocytophilum konnte auch im Hauptvektor der Anaplasmosen, *I. ricinus*, sowie in möglichen Reservoirwirten in Deutschland nachgewiesen werden [Stuenkel et al., 2013]. Die für *I. ricinus* in verschiedenen Studien ermittelte Infektionsrate lag zwischen 0 und 17,4% (Tabelle 4). Weiterhin liegen Berichte von manifesten klinischen Infektionen von Hunden und Pferden, welche auch durch humanpathogene *A. phagocytophilum*-Varianten ausgelöst werden können, vor [Von Loewenich et al., 2003; Kohn et al., 2011].

B.1.4.5 Pathogenese

A. phagocytophilum lebt obligat intrazellulär, im Menschen vornehmlich in neutrophilen Granulozyten. Die mögliche Infektion von Endothelzellen als Reservoir und Ausgangspunkt für den weiteren Befall von Granulozyten wird ebenfalls dis-

kutiert [Herron et al., 2005].

Vermittelt wird die Adhäsion von *A. phagocytophilum* an die Wirtszelle zumindest teilweise durch das bakterielle Oberflächenprotein msp2 [Park et al., 2003]. Da Anaplasmen weder Lipopolysaccharide noch Peptidoglykane besitzen, werden sie nicht von den auf Neutrophilen oder Monozyten bzw. Makrophagen befindlichen Toll-like-Rezeptoren bzw. NOD-Proteinen (Nucleotide Oligomerization Domain) erkannt und entgehen so der Elimination durch nachgeschaltete Signalkaskaden [Lin & Rikihisa, 2003]. Nachdem sie endozytiert wurden, verhindern Anaplasmen die Verschmelzung des Endosoms mit dem Lysosom und unterdrücken die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite um ihre eigene Abtötung zu vermeiden [Mott et al., 2002]. Im Schutz der intrazytoplasmatisch gelegenen Vakuolen vermehren sie sich und bilden Mikrokolonien aus, die als Morulae bezeichnet werden [Rikihisa, 2011]. Eine relevante Vermehrung wird durch Verzögerung der Apoptose der Granulozyten, die nach Kontakt mit Fremdan antigenen eine Lebensdauer von nur 24-48h aufweisen, ermöglicht. Die Beeinflussung der Funktion der Neutrophilen durch *A. phagocytophilum* reicht aber noch weiter, so wird die Fähigkeit der Neutrophilen zu Phagozytose und Diapedese gemindert. Zudem induziert *A. phagocytophilum* die prolongierte Degranulation der Granulozyten, was die Ursache der auftretenden inflammatorischen Gewebsschädigungen sein könnte [Dumler et al., 2005]. Insgesamt scheinen Neutrophile nicht in der Lage zu sein, *A. phagocytophilum* effektiv zu eradizieren. Daher stellen CD 4+ Zellen und die mit ihrer Aktivität verbundene Ausschüttung von INF- γ die Hauptakteure der Abwehr dar [Woldehiwet, 2010].

Um der adaptiven Immunantwort dennoch zu entgehen, können durch Genkonversion neue msp2 Protein-Varianten geschaffen werden, was die Persistenz der Infektion in einigen Wirten, wie zum Beispiel in Schafen erklärt [Rikihisa, 2011].

B.1.4.6 Klinische Manifestation, Therapie und Prävention

Die Mehrzahl der Infektionen mit *A. phagocytophilum* sind klinisch inapparent oder nehmen einen milden Verlauf. Vor allem ältere und immunsupprimierte Patienten haben ein erhöhtes Risiko, einen schweren Krankheitsverlauf zu erleiden. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen manifestiert sich die HGA mit unspezifischen grippeähnlichen Beschwerden, wie Fieber, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit und Myalgien. Selten berichtete Symptome sind Husten, Arthralgien, Ex-

antheme und gastrointestinale Beschwerden wie Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit und Übelkeit [Bakken & Dumler, 2006]. Aufgrund ihres immunsuppressiven Effekts begünstigen Anaplasmen das Auftreten opportunistischer Infektionen. Schwerwiegende Komplikationen wie atypische Pneumonien, ARDS und Sepsis wurden beschrieben [Dumler et al., 2007]. Die Letalität der HGA ist US-amerikanischen Daten zufolge mit $< 1\%$ niedrig [Bakken & Dumler, 2000]. Insgesamt scheint die Erkrankung in den Vereinigten Staaten tendenziell schwerer zu verlaufen als in Europa [Blanco & Oteo, 2002].

In den meisten Fällen heilt die HGA auch ohne antibiotische Therapie innerhalb von dreißig Tagen aus [Thomas et al., 2009]. Persistierende Infektionen, wie sie bei einigen erkrankten Säugetieren beobachtet werden, sind beim Menschen nicht zu finden [Ramsey et al., 2002].

Dennoch sollte wegen des Risikos komplikationsreicher Verläufe bei nachgewiesener symptomatischer Infektion eine Therapie mit Doxycyclin eingeleitet werden. Doxycyclin ist nach Meinung der CDC (Centers for Disease Control and Prevention)³ auch bei Kindern unter acht Jahren das Mittel der Wahl, da bei der empfohlenen Dosis und Therapiedauer keine nachteiligen Wirkungen auf die Zahnentwicklung zu erwarten sind [Bakken et al., 2006]. Bei Schwangeren oder bei Vorliegen einer Allergie gegen Tetrazykline kann Rifampicin alternativ eingesetzt werden [Bakken & Dumler, 2006]. Impfstoffe zur primären Prävention der Anaplasmosen sind derzeit nicht verfügbar. Ob eine abgelaufene Infektion zu bleibender Immunität führt, ist nicht hinreichend geklärt. Die Möglichkeit einer Reinfektion scheint jedoch zu bestehen [Horowitz et al., 1998a; Ismail et al., 2010].

³US-Amerikanische Gesundheitsbehörde

B.2 Zielsetzung

Um ein möglichst genaues Bild der **FSMEV** Verbreitung zu zeichnen und das Erkrankungsrisiko abzuschätzen, wird bisher vor allem die Zahl humaner Erkrankungsfälle betrachtet.

Vor dem Hintergrund zunehmender FSME-Impfraten gewinnt die Ermittlung der FSMEV-Prävalenz in Zecken als Monitoringinstrument zunehmend an Relevanz und sollte daher in der nachfolgenden Studie zur Klärung der aktuellen Verbreitung des FSMEV Verwendung finden. Außerdem stellte sich angesichts steigender europäischer Borrelioseinzidenzen bei der weder in Rheinland-Pfalz noch im Saarland, systematisch analysierten Prävalenz von *B. burgdorferi sensu lato* in Zecken die Frage nach der realen Verbreitung dieses Erregers.

Dagegen wurden Fälle einer HGA bisher deutschlandweit nicht verzeichnet, wobei das Vorhandensein von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* beim Menschen, sowie der Nachweis klinischer Infektionen bei Tieren in Deutschland indes für eine bestehende Gefährdung durch diesen Erreger sprechen. Weitere Anhaltspunkte zur Abschätzung der Gefährdung im Saarland und in Rheinland-Pfalz sollte die Bestimmung der Prävalenz von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* liefern.

Schlussendlich sollte ergänzend die Abhängigkeit der Infektionsrate der genannten Erreger vom jeweiligen Entwicklungsstadium und dem Geschlecht der Zecke ermittelt werden.

Die nachfolgende Arbeit stellt eine Pilotstudie dar, auf deren Ergebnis das weitere Vorgehen im Rahmen von Folgestudien aufgebaut werden kann. Sie entspricht in ihrer Zielsetzung den Anforderungen der 2007 verabschiedeten EU-Gesundheitsstrategie, durch entsprechende Maßnahmen die Bürger vor Gesundheitsgefahren im Zusammenhang mit dem Klimawandel zu schützen [EU Kommission, 2009].

C Material und Methoden

C.1 Sammlung der Zecken

C.1.1 Auswahl der Sammelorte

Insgesamt wurden 15 Gebiete beprobt, sieben davon im Saarland, acht in Rheinland-Pfalz.

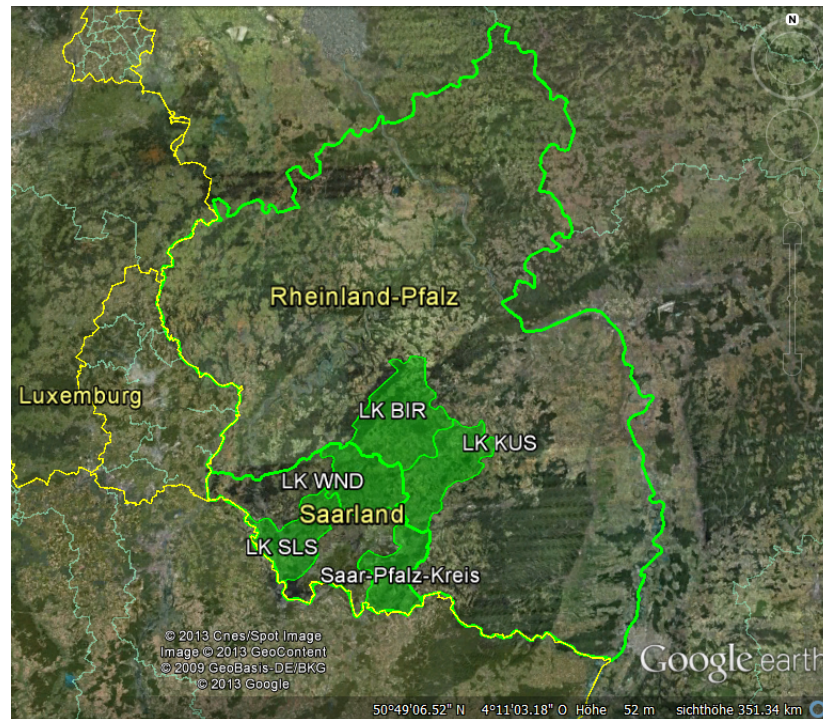


Abbildung 4: Übersichtskarte Saarland und Rheinland-Pfalz: Landkreise (LK), in denen gesammelt wurde, sind grün markiert. (SLS= Saarlouis, WND = St. Wendel, BIR= Birkenfeld, KUS = Kusel), Quelle Google Earth (01.04.2013)

Ausgewählt wurden Orte, an denen ein Zeckenbiss wahrscheinlich wird durch ein hohes Zeckenvorkommen bei gleichzeitig häufiger Frequentation durch Menschen. Ein ausreichender Probenumfang sollte durch die Wahl von für *Ixodes ricinus* geeignet erscheinenden Habitaten gewährleistet werden. So wurden vor allem Laub- und Mischwälder mit dichtem Untergrundbewuchs gewählt, die als Wanderwege, Picknick- und Rastplätze auch für Menschen attraktive Orte der Freizeitgestaltung darstellen.




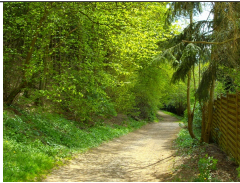




Sammelort		Charakteristika
1	A 62: Rastplatz Potzberg	 Ca. 200m breiter Wiesenabschnitt begrenzt von Gesträuch mit Picknickbänken. Stark verschmutzt durch Abfall und Fäkalien.
1N	Idar-Oberstein ↔ Schleiferweg	 Waldweg
2	Idar-Oberstein ↔ Idarbach ↔ Weiher-Schleife	 Parkplatz und Weg entlang der Weiher-Schleife und des Idarbachs. Stark touristisch frequentiert.
2N	Idar-Oberstein ↔ Am Unterstberg	 Waldweg
3	Idar-Oberstein ↔ Stadtteil Kirchenbollenbach ↔ Sportplatz	 Weg entlang des Sportplatzes bis zum Truppenübungsplatz Baumholder.
4	Idar-Oberstein ↔ Stadtteil Mittelbollenbach ↔ Spielplatz	 Begrünter Spielplatz an einem Bach. Dichter Pflanzenbewuchs.
5	Idar-Oberstein ↔ Stadtteil Mittelbollenbach ↔ Waldweg	 Hohlweg. Nur ca. 200m von Sammelort 4 entfernt. Angrenzende Kuhweide. Typischer Weg zum Ausführen von Hunden.
6	Idar-Oberstein ↔ Stadtteil Nahbollenbach ↔ Picknick-Platz	 Picknickplatz mit Bachlauf, angrenzende Pferdeweide. Am Rand viele Farne und Brennnesseln.

Tabelle 5: Sammelorte in Rheinland-Pfalz

Sammelort		Charakteristika
7	A1: Rastplatz Schellenbach	 Rastplatz mit Picknickbänken. Lebensmittelabfall lockt Mäuse an.
8	Straße Elversberg Richtung St. Ingbert ↪ 3 Waldwege	 3 Waldwege, die die Landstraße kreuzen. Dichtes Buschwerk. Nutzung durch Jogger, Spaziergänger, Hundebesitzer, Waldarbeiter
9	St. Ingbert ↪ Ortsteil Rohrbach ↪ Glashütter Weiher	 Naherholungsgebiet
10	St. Ingbert ↪ Ortsteil Rohrbach ↪ Feld am Ortseingang von Rohrbach	 Brach liegendes Feld an der Rohrbach. Brennnesseln, Farne und Stauden bieten Wild und Mäusen Unterschlupf.
11	St. Ingbert ↪ Gehnbachstraße	 An ein Wohngebiet angrenzendes Waldgebiet. Lauf- und Nordic Walking Treff.
12	St. Ingbert ↪ Ortsteil Rohrbach ↪ Weingangsweg	 Waldweg am Rande eines Wohngebietes, der zu einem Spielplatz führt.
13	Nohfelden ↪ Ortsteil Gonneseiler ↪ Bostalsee	 Weg entlang des Staudamms, viele Farne.

Tabelle 6: Sammelorte im Saarland

Neben der möglichen Zeckenexposition wurde bei der Wahl der Fanggebiete besonders die Datenlage zum Auftreten humaner FSME-Erkrankungen berücksichtigt. Da der Landkreis (LK) Birkenfeld als einziger Landkreis in Rheinland-Pfalz, gemäß der Definition des Robert-Koch-Institutes, den Status eines FSME-Risikogebiets innehat [Robert Koch-Institut, 2011], wurden zu Beginn der Studie fünf Fanggebiete in diesem Landkreis zur Beprobung ausgewählt (siehe Tabelle 5).

Ein weiteres Fanggebiet (Nummer 1) befand sich im Landkreis Kusel. Es handelte sich hierbei um einen Rastplatz an der Bundesautobahn (BAB) 62. Allerdings erwies sich das Zeckenvorkommen dort als gering, weshalb ab September 2011 ersatzweise entlang eines Waldweges unweit der Weiherschleife in Idar-Oberstein gesammelt wurde. Aus demselben Grund wurde ein Fanggebiet am Idarbach in Idar-Oberstein im September 2011 durch einen anderen Sammelort in Idar-Oberstein ersetzt.

Sammelschwerpunkt im Saarland war der Saarpfalz Kreis. Dort erfolgte die Beprobung an sechs Fangorten im Raum St. Ingbert-Rohrbach (siehe Tabelle 6), wo 2008 drei FSME-Fälle aufgetreten waren, welche auf einen Zeckenbiss innerhalb dieses Gebietes zurückgeführt wurden [Robert Koch-Institut, 2008a]. Weil die Anzahl der Neuerkrankungen jedoch unter der vom Robert Koch-Institut festgelegten Grenze für FSME-Risikogebiete lag, besaß der Saar-Pfalz-Kreis zum Zeitpunkt der Beprobung keinen Status als Risikogebiet. Vergleichbar mit dem Fanggebiet „Rastplatz Potzberg“ in Rheinland-Pfalz wurde auch im Saarland ein Rastplatz als Sammelort ausgewählt. Dieser befindet sich an der A1 im Landkreis Saarlouis. Ab September 2011 wurde die Sammlung zudem auf Wunsch des Gesundheitsministeriums um ein Fanggebiet in Gonnesweiler am Bostalsee im Landkreis St. Wendel erweitert.

Die genaue Lage der Sammelorte ist dem im Anhang befindlichen Kartenmaterial zu entnehmen.

C.1.2 Ablauf der Sammlung

Die Beprobung der genannten Sammelgebiete wurde von wissenschaftlichen Hilfskräften unter der Leitung von Prof. Dr. Heinz Mehlhorn (Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Gesammelt wurde von Juni bis September 2011, jeweils ein bis zweimal pro Monat an niederschlagsfreien Tagen. Das Fangen der Zecken erfolgte mit Hilfe der wissenschaftlich anerkannten Flaggenmethode [Ginsberg & Ewing, 1989]. Dabei wurde ein 1 x 2 m großes Baumwolltuch mit rauer Oberfläche in unterschiedlicher

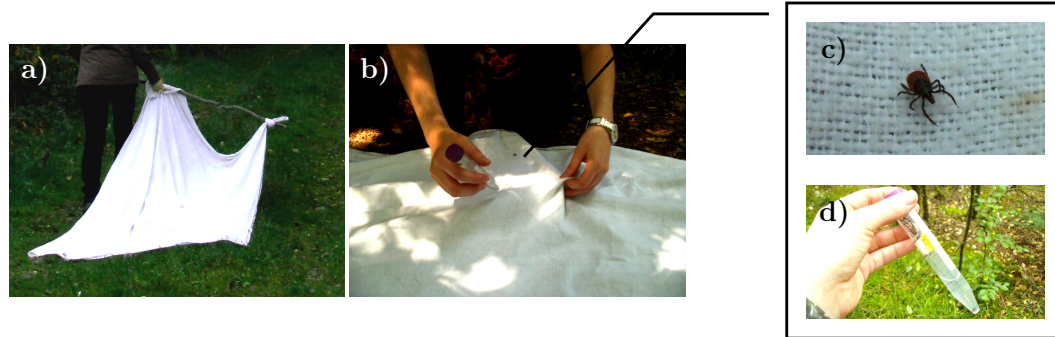


Abbildung 5: a) Zeckensammlung mit Baumwolltüchern, Weingangsweg b) Zecken werden vom Leintuch abgesammelt und in ein mit 100%igem- Ethanol gefülltes Probenröhrchen (d) überführt c) *Ixodes ricinus* Weibchen

Höhe über die Vegetation gestreift, um so adulte Zecken und Nymphen anzulocken (siehe Abbildung 5). Die vom Tuch abgesammelten Zecken wurden anschließend in mit 100%-igem Ethanol gefüllte Schraubröhrchen überführt und bis zur entomologischen Bestimmung durch Prof. Dr. Mehlhorn in Düsseldorf aufbewahrt. Im Anschluss an die Bestimmung von Artzugehörigkeit, Stadium und Geschlecht wurden die Proben an das Institut für Hygiene und Infektionsschutz des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz in Koblenz bzw. das Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes versandt, wo sie bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert wurden.

C.2 Molekularbiologische Methoden

C.2.1 Homogenisierung der Zecken

Die gefrorenen Zecken wurden zunächst aufgetaut und nach Absaugen des Alkohols einzeln in ein steriles Probengefäß (2 ml Reagiergefäß, Sarstedt) überführt und mit $450\ \mu\text{l}$ Lysepuffer (easyMAG, bioMérieux) versehen. Zu den Zecken wurden jeweils 3 sterile Stahlkugeln von 3 mm Durchmesser gegeben (Firma Martin). Die Homogenisierung erfolgte durch Schütteln im TissueLyser (Qiagen) mit einer Frequenz von 30 Hz für insgesamt 4 Minuten. Anschließend wurde das Homogenisat kurz mittels Tischzentrifuge bei 8000 rpm anzentrifugiert. Für das nachfolgende Nukleinsäure-Extraktionsverfahren wurden $200\ \mu\text{l}$ des Überstands verwendet. Das restliche Homogenisat wurde bei einer Temperatur von -70°C aufbewahrt.

C.2.2 Extraktion von Nukleinsäuren

C.2.2.1 Grundzüge des Extraktionsverfahrens

Die Isolierung der Nukleinsäuren erfolgte vollautomatisch mit dem NucliSENS®easyMAG™ der Firma bioMérieux. Die in diesem Gerät angewandte Extraktionsmethode basiert auf dem Prinzip der Silikaextraktion [Boom et al., 1990]. Nukleinsäuren binden dabei in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an magnetische Silikapartikel. Das im Lysepuffer enthaltene Guanidiniumthiocyanat bewirkt durch Herabsetzung der Oberflächenspannung von Zellen zunächst die Lyse zellulären Probematerials [Pöpping & Unterberger, 2010]. Es stört in seiner Eigenschaft als chaotropes Salz die Struktur von Wasser, die Entropie der Lösung nimmt zu. Die Löslichkeit apolarer Gruppen im Wasser steigt, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen, die die Tertiärstruktur von Proteinen stabilisieren, geschwächt werden. Proteine denaturieren und Nukleasen werden inaktiviert. Gibt man nun Silikapartikel zur Probe, bildet sich über Guanidinium-Kationen eine reversible Bindung zwischen der Silikaoberfläche und den ebenfalls negativ geladenen Nukleinsäuren aus [Minol & Gassen, 2003]. Im Verlauf der folgenden beiden Waschschrte hält ein Magnet die Silikapartikel mit den daran gebundenen Nukleinsäuren an der Wandung des Probenbehälters fest, während die Probe von verblieben Zellbestandteilen und Proteinen gereinigt wird [Kreuwel & Verwimp, 2004]. Abschließend erfolgt die Elution unter Niedrigsalzbedingungen mit einem anorganischen Puffer. Dabei werden Silika und Nukleinsäuren unter Erwärmung wieder voneinander getrennt. Im letzten Schritt werden die Silikapartikel schließlich durch Nutzung ihrer magnetischen Eigenschaften aus dem Eluat entfernt.

C.2.2.2 Aufreinigungprotokoll

Bei der Aufreinigung der Nukleinsäuren wurde das Extraktionsprotokoll “Specific B 2.0.1” des NucliSENS®easyMAG™ verwendet.

Als Ausgangsprobenvolumen wurden 200 μl eingesetzt. Nach geräteinterner Lysepufferzugabe erfolgte die Inkubation der Proben für 10 min. Danach wurden 100 μl Silica-Suspension zu jeder Probe gegeben. Nach Abschluss des Extraktionslaufs im Gerät wurde das Eluat sofort in Micro-Schraubenröhrchen (Sarstedt) überführt. Das Eluatvolumen betrug 55 μl , wovon 33 μl für die folgenden Nu-

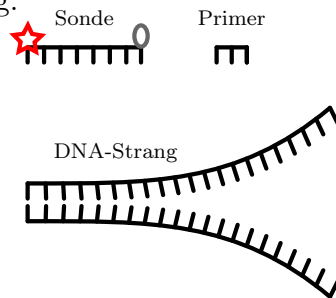
kleinsäurenachweisverfahren bei -20°C gelagert wurden. Das verbleibende Eluat wurde bei -70°C aufbewahrt.

C.2.3 Nachweis von Nukleinsäuren

C.2.3.1 Prinzip der Real-time PCR

Basierend auf dem Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA bzw. RNA von Kary Mullis stellt die Real-time PCR eine Möglichkeit dar, die Akkumulation der PCR-Produkte schon während der Reaktion zu messen [Mullis, 1985; Higuchi et al., 1992]. In der Regel werden Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion der Amplifikate verwendet. Der Anwender kann zwischen Farbstoffen, welche PCR-Produkte unabhängig von der Zielsequenz markieren,

Denaturierung:



Hybridisierung:



Elongation:

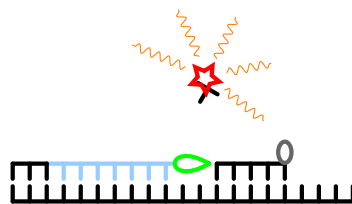


Abbildung 6: Funktionsweise TaqManTM-Sonde (Reporter/Donor=rot, Quencher=grau, DNA-Polymerase=grün), eigenes Bildmaterial

fluoreszenzmarkierten Primern und sequenzspezifischen Sonden wählen. Letztere ermöglichen den Nachweis mehrerer Zielsequenzen in einer Probe. Dies wird als Multiplex-PCR bezeichnet. Das Funktionsprinzip der meisten sequenzspezifischen Sonden beruht auf dem Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer (FRET) [Förster, 1948]. Dabei wird Energie strahlungsfrei von einem angeregten Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen. Donor und Akzeptor dürfen dazu nicht mehr als 10 nm voneinander entfernt sein. Außerdem müssen Emissionsspektrum des Donors und Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen [Clegg, 1995]. Dieses Prinzip wird bei den in dieser Arbeit verwendeten TaqManTM-Sonden, auf deren Funktionsweise im Folgenden näher eingegangen wird, angewandt [Holland et al., 1991; Lee et al., 1993].

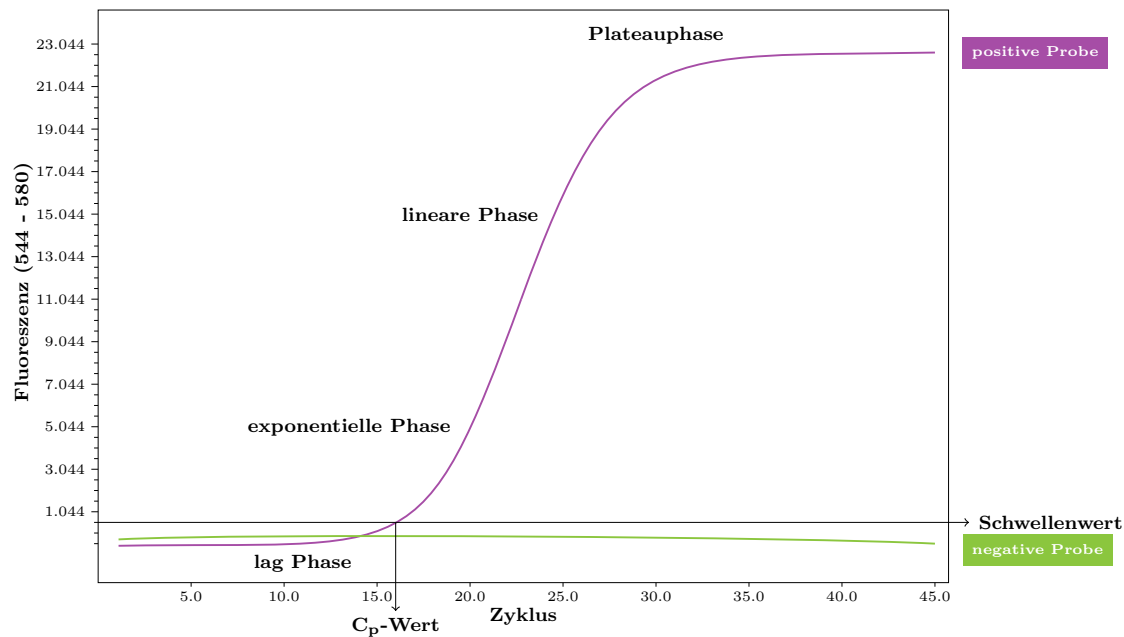


Abbildung 7: An die Darstellung des LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Basel) angelehnte Amplifikationskurve einer real-time PCR mit einer positiven (violett) und einer negativen (grün) Probe.

Die TaqManTM-Sonden tragen am 5'-Ende einen Donor-Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und am 3'-Ende ein als Quencher bezeichnetes Akzeptormolekül. Der Reporter wird durch vom Gerät ausgesandtes Licht angeregt. Ist die Sonde intakt, wird die Energie des Reporters via FRET auf den Quencher übertragen und in Fluoreszenzstrahlung oder Wärme im Fall von Dark Quenchern (z.B. Blackberry® Quencher) oder Black Hole Quenchern, umgewandelt. Bei Verwendung von Dark oder Black Hole Quenchern ist zu diesem Zeitpunkt also keine Fluoreszenz messbar. In der Hybridisierungsphase binden Primer und Sonden an den Matrizenstrang. Die DNA-Polymerase trifft bei der Elongation auf die Sonde und schneidet sie mit Hilfe ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Reporter und Quencher werden voneinander getrennt, so dass der Abstand zwischen beiden so groß wird, dass der Reporter-Farbstoff Licht spezifischer Wellenlänge aussendet. Dieses kann am Ende der Elongationsphase vom Gerät detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte mit jedem Zyklus an.

Wird die Fluoreszenz gegen die Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen aufgetragen, so erhält man, wie in Abbildung 7 dargestellt, eine sigmoidale Kurve mit vier typischen Abschnitten. In der ersten Phase der Reaktion (lag-Phase) ist das Signal

	Sequenz 5' → 3'
F-FSME	GGG CGG TTC TTG TTC TCC
R-FSME	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT
FSME-Sonde	FAM – TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA – BHQ-T-P internal
F-16sIxodes	AAA AAA ATA CTC TAG GGA TAA CAG CGT AA
R-16sIxodes	ACC AAA AAA GAA TCC TAA TCC AAC A
16s-Ixode-Sonde	HEX – TTT TGG ATA GTT CAT ATA GAT AAA ATA GTT TGC GAC CTC G – BHQ-T-P internal

Tabelle 7: Primer- und Sondensequenzen zum FSME Virus- und 16sIxodes-Nachweis nach Schwaiger und Cassinotti (2003)– modifiziert

schwach und kann nicht von der Hintergrundfluoreszenz abgegrenzt werden. Der Zyklus in dem das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet wird als C_p -Wert (crossing-point) oder C_t -Wert (cycle threshold) bezeichnet. Der C_p -Wert kennzeichnet den Beginn der exponentiellen Phase. In der linearen Phase nimmt die Effizienz der PCR ab. Die Amplifikationsrate sinkt immer weiter, bis die Plateauphase erreicht ist.

C.2.3.2 Nachweis von FSME-Virus-RNA

Der Nachweis des FSME-Virus erfolgte im Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in eigenverantwortlicher Arbeit. In Erwartung niedriger FSMEV Prävalenzen im Saarland und in Rheinland-Pfalz wurden Pools aus jeweils fünf Individualeluaten unter Berücksichtigung von Stadium und Geschlecht der Zecken in die PCR eingesetzt [Süss et al., 2002]. Bei einer solchen Poolgröße ist der Nachweis einer einzelnen FSMEV-positiven Zecke innerhalb des Pools bei der verwendeten PCR möglich [Eistetter et al., 1998; Klaus et al., 2010b].

Der Nachweis von FSMEV-RNA erfolgte mittels real-time Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durch Amplifikation eines 68bp großen Fragmentes der 3'-nicht kodierenden Region des FSMEV Genoms. Konnte FSMEV-RNA in einem Pool nachgewiesen werden, so wurden die Individualeluate getrennt voneinander überprüft. Alle verwendeten Primer- und Sondensequenzen stammen von Schwaiger und Cassinotti [Schwaiger & Cassinotti, 2003], während der dort beschriebene Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil nach Anleitung von Dr. Christine Klaus

(Friedrich-Löffler-Institut, Jena) verändert wurden (Tabellen 7 - 10).

Substanz	a) Vol. (μ l)	b) Vol. (μ l)
Aqua destillata	5,0	2,5
2x RT-PCR Puffer (AgPath ID TM One-Step RT-PCR Kit)	12,5	12,5
25x RT-PCR Enzym-Mix (AgPath ID TM One-Step RT-PCR Kit)	0,5	1,0
Sonden-Primer-Mix FSME*	2,0	2,0
Sonden-Primer-Mix 16sIXO*		2,0
Sonden-Primer-Mastermix (S-P-MM)	20,0	20,0
Probe	5,0	5,0
Reaktionsvolumen	25,0	25,0

Tabelle 8: Reaktionsansatz der Real-time PCR zum FSME-Virus Nachweis a) mit bzw. b) ohne endogene Kontrolle (16sIxodes Nachweis) (* siehe Tabelle 9)

Substanz	Volumen (μ l)
2,0	Sonde (100 μ M)
2,5	Forward-Primer (100 μ M)
2,5	Reverse-Primer (100 μ M)
93,0	Aqua destillata
100,0	Sonden-Primer-Mix (S-P-M)

Tabelle 9: Erstellung des Sonden-Primer-Mixes

Prozess		Anzahl der Zyklen	Zeit (s)	Temperatur (°C)
Reverse Transkription		1	600	50
Inaktivierung RT		1	300	95
Aktivierung AmpliTaqGold®DNA Polymerase				
Denaturierung				
Amplifikation	Denaturierung	42	15	95
	Primerhybridisierung		20	56
	Elongation		30	72
Kühlung		1	30	40

Tabelle 10: Temperaturprofil der Mono- und Duplex-PCR zum FSME-Virus Nachweis mit bzw. ohne endogene Kontrolle (16sIxodes Nachweis)

Zur Überprüfung von Extraktionslauf und PCR-Reaktion wurde in einem Drittel der Proben gleichzeitig das mitochondriale 16s rRNA-Gen von *Ixodes ricinus* vervielfältigt [Schwaiger & Cassinotti, 2003] (Tabelle 7). In jeden Testlauf wurden außerdem zwei Positiv- und eine Negativkontrolle eingeschlossen. Bei den Positivkontrollen handelt es sich um mit Hilfe von QIAamp Viral RNA Mini Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigte Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen zweier FSME-Virus Stämme. Diese wurden von Herrn Prof. Dr. Matthias Niedrig (Robert Koch-Institut, Berlin) und von Herrn PD Dr. Gerhard Dobler (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München) zu Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser an Stelle von Nukleinsäuren zum Reaktionsgemisch gegeben.

Die RT-PCR wurde im LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Basel) unter Verwendung des AgPath ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City) durchgeführt.

C.2.3.3 Nachweis von Borrelien und Anaplasmen-DNA

Zum Nachweis *B. burgdorferi* s. l.- und *A. phagocytophilum*-spezifischer Nukleinsäuren wurde eine qualitative real-time Duplex-PCR am Institut für Hygiene und Infektionsschutz, Fachbereich Humanmedizin des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz in Koblenz unter Leitung von Dr. Manfred Vogt und Dr. Heinz-Georg Meyer etabliert. Die dazu benötigten Primer- und Sondensequenzen (Tabelle 11) entstammen [Schwaiger et al., 2001] bzw. [Courtney et al., 2004].

In der von Schwaiger et al. entwickelten TaqMan®-PCR wird ein 174bp großer Abschnitt des chromosomalen Flagellin-Gens (fla) von *B. burgdorferi* vervielfältigt. Hierdurch können die vier am häufigsten in Europa vorkommenden humanpathogenen Borrelien species *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto* und *B. valaisiana* spezifisch auch in Zecken nachgewiesen werden [Leutenegger et al., 1999; Schwaiger & Cassinotti, 2003]. Der Nachweis der seltener vorkommenden humanpathogenen Spezies *B. bavariensis* und *B. spielmanii* ist ebenfalls möglich. *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. anserina*, *B. coriaceae*, *B. hermsii*, *B. japonica*, *B. parkeri*, *B. turicatae* werden nicht detektiert. Außerdem treten keine Kreuzreaktion mit anderen Bakterien, Viren oder Pilzen auf.

Die TaqMan®-PCR nach Courtney et al. ermöglicht den spezifischen Nachweis

		Sequenz (5' → 3')
a	F-FlaF1A	AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A
	R-FlaR1	GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA
	FlaSonde	FAM – TGC TAC AAC CTC ATC TGT CAT TGT AGC ATC TTT TAT TTG – BBQ
b	F-ApMSP2	ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT
	R-ApMSP2	TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA
	ApMSP2	HEX – TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG –
	Sonde	BBQ

Tabelle 11: Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden zum Nachweis von: a) *B. burgdorferi sensu lato* spezifischer Nukleinsäuren nach Schwaiger et al. (2001) b) *A. phagocytophilum* spezifischer Nukleinsäuren nach Courtney et al. (2004)

von *A. phagocytophilum* in Zecken durch Amplifikation eines 77bp umfassenden Abschnittes der aminoterminalen Region des msp2-Gens [Courtney et al., 2004]. Durch Amplifikation der multiplen paralogen msp2-Genvarianten wird die Sensitivität der PCR gesteigert. *A. marginale*, der Erreger der bovinen Anaplasmose, wird nicht detektiert. Auch kommt es nicht zu Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien. Die Markierung der Sonden wurde entsprechend der Anforderungen der Multiplex-PCR modifiziert. Anstelle von TAMRA⁴ wurde das 3'-Ende der Sonden jeweils mit einem Blackberry®-Quencher gekoppelt, welcher als Dark Quencher im Gegensatz zu TAMRA keine Fluoreszenz freisetzt. Die PCR wurde im LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Basel) unter Verwendung des LightCycler®TaqMan® Reaktionsmixes von Roche durchgeführt. Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind in den Tabellen 12 - 14 aufgeführt. Um die Werte von Mono- und Duplex-PCR vergleichen zu können, wurden 10 Prozent der Proben zusätzlich mittels Mono-PCR untersucht. Reaktionsansatz und Temperaturprofil wurden dazu leicht verändert (siehe Tabellen 12 und 14).

⁴TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin

Substanz	a) Vol. (μ l)	b) Vol. (μ l)	c) Vol. (μ l)
Aqua destillata	9,0	10,0	10,0
5x Mastermix	4,0	4,0	4,0
Sonden-Primer-Mix Borrelia*	1,0	1,0	
Sonden-Primer-Mix Anaplasma*	1,0		1,0
Sonden-Primer-Mastermix (S-P-MM)	15,0	15,0	15,0
Probe	5,0	5,0	5,0
Reaktionsvolumen	20,0	20,0	20,0

Tabelle 12: Reaktionsansatz a) der Duplex-PCR zum Nachweis Borrelien- und Anaplasmen- spezifischer Nukleinsäuren b) der Mono-PCR zum Nachweis Borrelien-spezifischer Nukleinsäuren c) der Mono-PCR zum Nachweis Anaplasmen- spezifischer Nukleinsäuren (*: siehe Tabelle 13)

Volumen (μ l)	Substanz
2,5	Sonde (20 μ M)
1,0	Forward-Primer (100 μ M)
1,0	Reverse-Primer (100 μ M)
5,5	Aqua destillata
10,0	Sonden-Primer-Mix (S-P-M)

Tabelle 13: Erstellung des Sonden-Primer-Mixes

Prozess		Anzahl der Zyklen	Zeit (s)	Temperatur (°C)
Aktivierung FastStart® DNA Polymerase		1	600	95
Denaturierung				
Amplifikation	Denaturierung		10	95
	Primerhybridisierung		15	56
	Elongation		15	72
Kühlung		1	30	40

Tabelle 14: Temperaturprofil der Duplex-PCR zum Nachweis Borrelien- und Anaplasmen- spezifischer Nukleinsäuren sowie der Mono-PCR zum Nachweis Borrelien-spezifischer Nukleinsäuren. *Mono-PCR Anaplasma abweichend: Um ein Grad Celsius erhöhte Primerhybridisierungstemperatur.

In jedem PCR-Lauf wurden als Positivkontrollen die verdünnte DNA eines von Dr. Bernd Hoffmann (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) zur Verfügung gestellten *B. afzelii* Stammes, sowie eine, die Zielsequenz des msp2-Gens von *A. phagocytophilum* enthaltende Plasmidkontrolle von TIB MOLBIOL (Berlin) mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde bei der Untersuchung der ersten Hälfte der Proben 5 μ l destilliertes Wasser zum Reaktionsgemisch gegeben. Um den Probendurchsatz zu erhöhen, diente bei der Untersuchung der verbliebenen Hälfte der Proben jeweils die Positivkontrolle der Borrelien als Negativkontrolle für die Anaplasmen-PCR und entsprechend umgekehrt.

Alle Werte oberhalb des bei einem $C_p \geq 40$ festgelegten Cut-off wurden mittels Duplex-PCR nachkontrolliert. Ergab die Zweitbestimmung einen C_p -Wert < 40 wurde die Probe als positiv gewertet.

C.3 Verwendete Reagenzien und Geräte

Allgemeine Materialien und Geräte	
Einmalpipettenspitzen, gestopft (10 μ l, 1000 μ l), OneTouch	Sorenson TM BioScience Inc., Salt Lake City, USA
Einmalpipettenspitzen, gestopft (200 μ l), ART [®] XLP 200	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Handschuhe, Nitril 3000	Meditrade, Kiefersfelden
Micro-Schraubenröhre (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhre (15 ml, 120 x 17 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-Seal-Reagiergefäß (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitswerkbank, Lamin Air [®]	Heraeus, Hanau
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht
Pipette, pipetman [®] (P10,P20,P200,P1000)	Gilson Inc., Middleton, USA
Vortexer MS1 Minishaker	IKA [®] , Staufen

Homogenisierung der Zecken	
Lysepuffer (NucliSENS [®] easyMAG TM 2.0)	bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich
Stahlkugeln (\varnothing 3mm, 5mm)	Martin, Perosa Argentina, Italien
TissueLyser	Qiagen, Hilden

Nukleinsäureextraktion	
NucliSENS [®] easyMAG TM 2.0	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
NucliSENS [®] easyMAG TM Dis-ponsables and Silica	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

Real-time PCR	
LightCycler [®] 480	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
LightCycler [®] 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
FSME / 16sIxodes – spezifische PCR	
Primer / TaqMan TM Sonden	BioSpring, Frankfurt am Main
AgPath-ID TM One Step PCR Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Borrelia burgdorferi sensu lato / Anaplasma phagocytophilum – spezifische PCR	
Primer / TaqMan TM Sonden	TIB MOLBIOL, Berlin
Plasmidkontrolle (msp2-Gen)	TIB MOLBIOL, Berlin
LightCycler TM TaqMan TM Master	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz

C.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse, sowie die Erstellung der Grafiken wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel® 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) durchgeführt. Ergänzend wurde R 3.0.2⁵ verwendet.

Die Konfidenzintervalle (KI) der Infektionsraten, d.h. die Bereiche, die den wahren Wert der Infektionsrate mit einer vorher festgelegten Wahrscheinlichkeit $1 - \alpha$ umfassen, wurden unter Zugrundelegung der Binomialverteilung mit einer Überdeckungswahrscheinlichkeit von 95% ermittelt. Für hinreichend große Anteilswerte (a) erfolgte die Berechnung des Konfidenzintervalls nach Wilson [Wilson, 1927]. Da die Überdeckungswahrscheinlichkeit des Wilson-KI für Anteilswerte nahe bei 0 großen Schwankungen unterliegt, wurde für $a \leq 0,02$ das Clopper-Pearson Konfidenzintervall bestimmt [Lawrence D. Brown, 2001; Clopper & Pearson, 1934]. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass es für keinen zulässigen Anteilswert das Niveau $(1 - \alpha)$ unterschreitet.

Bei Vorliegen unverbundener Stichproben wurde mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest auf eine mögliche Abhängigkeit der Infektionsrate vom jeweiligen Entwicklungsstadium, vom Geschlecht, vom Fanggebiet der Zecken bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ geprüft. Voraussetzung für die Durchführung des Chi-Quadrat-Tests ist, dass weniger als zwanzig Prozent der errechneten erwarteten Häufigkeiten Werte kleiner oder gleich fünf erreichen. War diese Voraussetzung nicht erfüllt, wurde der exakte Test von Fisher angewandt [Fisher, 1925].

⁵freie Software (GNU General Public Licence)

D Ergebnisse

D.1 Ergebnisse der Zeckensammlung

Insgesamt wurden 1800 Zecken gesammelt, davon 870 in Rheinland-Pfalz und 930 im Saarland. Die entomologische Analyse ergab nahezu ausschließlich Zecken der Art *Ixodes ricinus* als den für den hiesigen Verbreitungsraum typischen Vektor. Zudem wurde im Juli 2011 ein adultes, ungesogenes Weibchen der offenbar eingewanderten Art *Dermacentor reticulatus* am Fangort 3 in Idar-Oberstein gefunden. *D. reticulatus* wurde wie in Abschnitt C beschrieben in die mikrobiologische Analyse einbezogen. Da diese keinen positiven Befund erbrachte, wird im Folgenden nicht mehr gesondert auf *Dermacentor reticulatus* eingegangen.

Die Verteilung aller Zecken nach Entwicklungsstadien und Geschlecht ist aus Abbildung 8 ersichtlich.

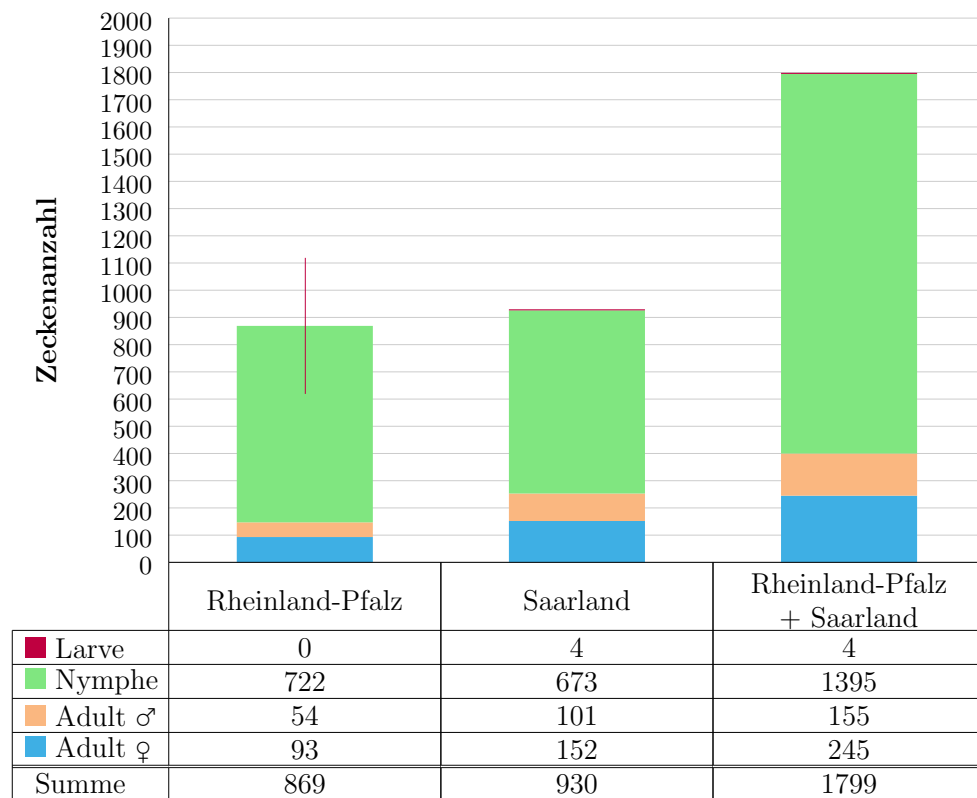


Abbildung 8: Absolute Häufigkeit der gesammelten Zecken (*I. ricinus*) im Saarland und in Rheinland-Pfalz nach Stadium bzw. Geschlecht.

Insgesamt wurden 3,5-mal so viele Nymphen gefangen wie adulte Zecken. In Rheinland-Pfalz lag das Adulte-Nymphen-Verhältnis bei 1 : 4,9, im Saarland bei 1 : 2,7. Außerdem wurden vier Larven im Saarland gesammelt.

D.2 Erregerprävalenz in *Ixodes ricinus*

D.2.1 Prävalenz von FSMEV-RNA

Die PCR auf FSMEV-RNA ergab in beiden Bundesländern jeweils einen Positivbefund in einer einzelnen Zecke. Die Erregerprävalenz betrug demnach, bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zecken 2 von 1799 bzw. 0,11% (KI [0,01%; 0,4%]).

Der FSMEV-Nachweis in Rheinland-Pfalz erfolgte im Juni 2011 am Sammelort 5 im Landkreis Birkenfeld (Mittelbollenbach, Waldweg). Bei der FSMEV-positiven Zecke handelte es sich um eine Nymphe. Im Saarland konnte das FSMEV in einem adulten Weibchen, welches im Juli 2011 am Sammelort 12 im Saarpfalz-Kreis (Rohrbach, Weingangsweg) gefangen wurde, nachgewiesen werden.

Die FSMEV-Prävalenz, berechnet für die Gesamtzahl der am jeweiligen Fangort gesammelten Zecken, betrug 0,43%(1/230) für den Sammelort 5 in Rheinland-Pfalz und 0,56%(1/178) für den Sammelort 12 im Saarland.

Bezogen auf das Stadium der Zecken lag die FSMEV-Prävalenz für in Rheinland-Pfalz gesammelte Nymphen bei 0,14% (KI [0,00%; 0,77%]) bzw. für im Saarland gesammelte adulte Zecken bei 0,4% (KI [0,01%; 2,20%]). Betrachtet man die Landkreise, in denen die positiven Zecken gefunden wurden gesondert, so waren im Landkreis Birkenfeld Nymphen zu 0,15% (KI [0,00%; 0,82%]) bzw. im Saarpfalz-Kreis gesammelte adulte Zecken zu 0,42% (KI [0,07%; 2,35%]) Träger des FSMEV.

D.2.2 Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA

D.2.2.1 Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA nach Sammelort

Bei den molekularbiologischen Analysen konnte in 20,0% (KI [18,2%; 21,9%]) aller Zecken Borrelien-DNA nachgewiesen werden. Die ermittelte Infektionsrate erreichte in Rheinland-Pfalz mit 22,1% (KI [19,5%; 25,0%]) signifikant höhere Werte als im Saarland (p -Wert = 0,03). Dort betrug die Borrelien-Prävalenz 18,0% (KI [15,6%; 20,6%]).

Sammelort		Anzahl unter- suchter Zecken	Borrelien- positive Zecken (Prävalenz [%])	Anaplasmen- positive Zecken (Prävalenz [%])
1	A 62: Rastplatz Potzberg	61	12 [19,7]	3 [4,9]
1N	Idar-Oberstein: Schleiferweg	47	12 [25,5]	0 [0,0]
2	Idar-Oberstein: Weiher-Schleife	12	4 [33,3]	0 [0,0]
2N	Idar-Oberstein: Am Unterstberg	7	1 [14,3]	0 [0,0]
3	Idar-Oberstein, Stadtteil Kirchenbollenbach: Sportplatz	388	88 [22,7]	6 [1,5]
4	Idar-Oberstein, Stadtteil Mittel- bollenbach: Spielplatz	58	11 [19,0]	3 [5,2]
5	Idar-Oberstein, Stadtteil Mittel- bollenbach: Waldweg	230	53 [23,0]	3 [1,3]
6	Idar-Oberstein, Stadtteil Nahbol- lenbach: Wassertretplatz	66	11 [16,7]	0 [0,0]
GESAMT Rheinland-Pfalz		869	192 [22,1]	15 [1,7]
7	A1: Rastplatz Schellenbach	100	30 [30,0]	1 [1,0]
8	Straße Elversberg - St. Ingbert: drei Waldwege	103	22 [21,4]	1 [1,0]
9	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Glashütter Weiher	231	40 [17,3]	4 [1,7]
10	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Feld am Ortseingang von Rohr- bach	209	23 [11,0]	9 [4,3]
11	St. Ingbert: Gehnbachstraße	86	15 [17,4]	0 [0,0]
12	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Weingangsweg	178	35 [19,7]	2 [1,1]
13	Nohfelden, Ortsteil Gonnesweiler: Bostalsee	23	2 [8,7]	1 [4,3]
GESAMT Saarland		930	167 [18,0]	18 [1,9]
GESAMT Rheinland-Pfalz und Saarland		1799	359 [20,0]	33 [1,8]

Tabelle 15: Übersicht der ermittelten Prävalenzen von *B. burgdorferi s.l.* bzw. *A. phagocytophilum* nach Sammelort.

Unter Berücksichtigung der Zeckenstadien war in Rheinland-Pfalz der Anteil Borrelien-positiver Nymphen mit etwa 20,1% signifikant größer als im Saarland (p -Wert = 0,001), wo er 13,6% betrug, jedoch war kein signifikanter Unterschied der Erregerprävalenzen adulter Zecken nachweisbar. Dieselben Ergebnisse resultierten bei Betrachtung der Nymphen bzw. Adulten der Sammelschwerpunkte allein, also des Landkreises Birkenfeld gegenüber dem Saarpfalz-Kreis. Von einem statistischen Vergleich der Prävalenzen der einzelnen Fangorte miteinander wurde aufgrund der teilweise geringen Stichprobenzahl, aus der große Konfidenzintervalle für die Prävalenzen der Fangorte resultieren, abgesehen.

Unter der Gesamtzahl der untersuchten Zecken wiesen 1,8% (KI [1,3%; 2,6%]) eine Infektion mit *A. phagocytophilum* auf. In Rheinland-Pfalz waren 1,7% (KI [1,0%; 2,8%]) der Zecken infiziert, im Saarland 1,9% (KI [1,2%; 3,0%]). Hier bestand im Gegensatz zur Infektion mit Borrelien kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Infektionsrate zwischen den beiden Bundesländern (p -Wert = 0,74).

D.2.2.2 Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA nach Stadium und Geschlecht

Die Borrelien-Prävalenz in der untersuchten Zeckenpopulation reichte von 17,0% (237/1395) bei Nymphen bis hin zu 30,5% (122/400) bei adulten Zecken. Die Anaplasmen-Prävalenz lag mit 5,8% (23/400) bezogen auf den Anteil adulter Zecken ebenfalls über der für Nymphen ermittelten Prävalenz von 0,7% (10/1395). Bei Larven konnte keine Infektion mit einem der bakteriellen Erreger nachgewiesen werden.

Die statistische Analyse ergab bei Betrachtung aller adulter Zecken und Nymphen, sowie auch von Adulten bzw. Nymphen der jeweiligen Bundesländer, eine hochsignifikante Abhängigkeit der Infektion mit Anaplasmen und Borrelien vom Entwicklungsstadium (p -Wert < 0,001).

Dagegen konnte kein signifikanter Einfluss des Geschlechtes adulter Zecken auf die Infektionsrate nachgewiesen werden (p -Wert_{Borrelien} = 0,95 bzw. p -Wert_{Anaplasmen} = 0,97).

Insgesamt waren 30,6% (KI [25,2%; 36,6%]) der weiblichen und 30,3% (KI [23,6%; 38,0%]) der männlichen Adulten mit Borrelien, beziehungsweise 5,7% (KI [3,4%; 9,4%]) der weiblichen und 5,8% (KI [3,1%; 10,7%]) der männlichen Adulten mit Anaplasmen infiziert.

Fanggebiet	Stadium / Geschlecht	Anzahl untersuchter Zecken	Borrelien-spezifische Nukleinsäuren		Anaplasmen-spezifische Nukleinsäuren	
			Anzahl positiver Zecken	Prävalenz [%]	Anzahl positiver Zecken	Prävalenz [%]
Rheinland-Pfalz	Adult ♀ + ♂	147	47	32,0	7	4,8
	♀	93	28	30,1	5	5,4
	♂	54	19	35,2	2	3,7
	Nymphe	722	145	20,1	8	1,1
	Larve	0	0	0,0	0	0,0
	Gesamt	869	192	22,1	15	1,7
Saarland	Adult ♀ + ♂	253	75	29,6	16	6,3
	♀	152	47	30,9	9	5,9
	♂	101	28	27,7	7	6,9
	Nymphe	673	92	13,7	2	0,3
	Larve	4	0	0,0	0	0,0
	Gesamt	930	167	18,0	18	1,9
Rheinland-Pfalz + Saarland	Adult ♀ + ♂	400	122	30,5	23	5,8
	♀	245	75	30,6	14	5,7
	♂	155	47	30,3	9	5,8
	Nymphe	1395	237	17,0	10	0,7
	Larve	4	0	0,0	0	0,0
	Gesamt	1799	359	20,0	33	1,8

Tabelle 16: Übersicht der ermittelten Prävalenzen von *B. burgdorferi* s.l. bzw. *A. phagocytophilum* nach Stadium und Geschlecht

D.2.3 Koinfektionen

Der Anteil der Zecken, die beide bakterielle Erreger trugen, belief sich auf 5 von 1799 bzw. 0,3% (KI [0,1%; 0,6%]). Es handelte sich dabei um adulte Zecken, davon zwei weibliche und drei männliche, welche alle im Saarland gefunden wurden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Zecken im Saarland betrug die Koinfektionsrate 0,5% (KI [0,17%; 1,25%]), wobei rund 2% der adulten Zecken mit beiden Erregern infiziert waren. Somit waren signifikant mehr Adulte koinfiziert als Nymphen (p-Wert = 0,001).

Zwei der Zecken stammten aus dem Fanggebiet neun (Rohrbach, Glashütter Weiher). Von den verbliebenen drei wurde jeweils eine in den Fanggebieten sieben (A1, Rastplatz Schellenbach), zehn (Rohrbach, Feld) und dreizehn (Nohfelden, Bostalsee) gesammelt.

Zudem waren beide FSMEV-positiven Zecken auch mit Borrelien infiziert.

E Diskussion

E.1 Zeckensammlung

Insgesamt konnten von Juni und September 2011 1800 Zecken an fünfzehn Fangorten in Rheinland-Pfalz und im Saarland gesammelt werden. Aufgrund der niedrigen Fangzahl von 12 Zecken nach insgesamt vier Sammlungen wurde der Fangort 2 in Idar-Oberstein ersetzt. Ursachen der niedrigen Abundanz könnten unzureichend humide mikroklimatische Bedingungen aufgrund der, an diesem Ort weniger ausgeprägten Bodenstreu sein. Alternativ ist ein zu geringes Wirtsvorkommen denkbar. Ein Vergleich des Zeckenvorkommens der verschiedenen Sammelorte war wegen der nicht standardisierten Beprobungsfläche nicht möglich.

Bei 1799 der Zecken handelte es sich um *Ixodes ricinus*, wodurch die Stellung dieser Art als häufigste in Deutschland vorkommende Zeckenart unterstrichen wird.

Die Zeckenpopulation Deutschlands besteht jedoch nicht allein aus *I. ricinus*, hierzulande kommen auch weitere Zeckenarten, wie zum Beispiel *Dermacentor spp.*, *Rhipicephalus sanguineus* oder *Hyalomma marginatum* vor. Der Flaggenmethode zum Zeckenfang sind allerdings ausschließlich wirtssuchende, exophile Zeckenarten zugänglich, welche sich allein für die Dauer der Blutmahlzeit auf dem Wirt aufhalten.

Es gelang neben *I. ricinus* eine ungesogene weibliche adulte Zecke, der am zweithäufigsten vertretenen Zeckenart, *Dermacentor reticulatus*, der Auwaldzecke, in Idar-Oberstein in Rheinland-Pfalz zu fangen. Die Auwaldzecke gehört, wie *Ixodes ricinus*, zur Familie der Schildzecken, entsprechend ähnelt ihr Entwicklungszyklus dem des gemeinen Holzbocks. Die Entwicklung vom Ei zur adulten Zecke kann jedoch bereits innerhalb eines Jahres vollendet werden [Gray et al., 2009]. Die Verbreitung von *D. reticulatus* innerhalb Deutschlands ist hoch fokal [Dautel et al., 2006]. Aus beiden untersuchten Bundesländern wurde bereits das Auftreten dieser Spezies berichtet. Da insgesamt allerdings nur ein Exemplar gefunden wurde, ist in Betracht zu ziehen, dass dieses aus einem anderen Gebiet eingeschleppt wurde [Beelitz et al., 2012; Rubel et al., 2014]. Das Vorkommen von *D. reticulatus* an den beprobten Arealen kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da zum einen nicht explizit auf die Habitatspräferenzen der Auwaldzecke, die Feuchtgebiete mit viel Lichteinfall bevorzugt, eingegangen worden ist. Zum anderen könnten Habitate von *D. reticulatus* aufgrund ihrer fokalen Verteilung leicht bei der eher punktuellen Sammlung verfehlt

worden sein [Dautel et al., 2006].

Der Befall von Menschen durch *D. reticulatus* ist selten. Meist sind Menschen betroffen, die mit den häufiger befallenen Wirten der adulten Auwaldzecke, zum Beispiel mit Hunden, in Kontakt stehen [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009]. Beim Stich ist die Möglichkeit der Transmission von Krankheitserregern gegeben. So gilt *D. reticulatus* in Europa als Hauptvektor von *Babesia canis*, dem Erreger der für Hunde gefährlichen Babesiose [Kampen & Werner, 2011]. Für Menschen spielt in erster Linie die Übertragung von *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* und von Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe (*R. conorii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*), eine Rolle [Robert Koch-Institut, 2007a]. In vorausgegangenen Studien konnte *B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum* und FSME-Viren ebenfalls in Zecken dieser Art nachgewiesen werden, auch wenn eine Vektorrolle von *D. reticulatus* für diese Erreger bisher noch nicht experimentell bestätigt wurde [Hagedorn, 2013; Reye et al., 2013; Biernat et al., 2014]. Im Gegenteil konnten in künstlich infizierten *D. reticulatus* im Unterschied zu *I. ricinus* bereits nach einer Woche keine lebenden Spirochäten mehr detektiert werden [Mátlová et al., 1996].

Der Nachweis von Borrelien, Anaplasmen oder FSME-Viren in dem in dieser Studie gefangenen Exemplar gelang nicht.

Bei dem Hauptteil der gesammelten *I. ricinus* in beiden Bundesländern, genauer bei 83% in Rheinland-Pfalz bzw. 72% im Saarland, handelte es sich um Nymphen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen zahlreicher Zeckensammlungen überein und liegt darin begründet, dass sich nur etwa 80% der Nymphen zur adulten Zecke weiterentwickeln [Randolph, 2013]. Nymphen sind das am häufigsten am Menschen parasitierende Zeckenstadium. Ihre Schneidewerkzeuge sind im Gegensatz zu denen von Larven leicht dazu fähig, die Haut von Menschen zu durchdringen. Zudem bedingt ihre geringe Größe im Vergleich zu Adulten spätes Entdecken [Klaus et al., 2010c].

Die geringe Larvenanzahl von insgesamt vier Larven erklärt sich in erster Linie durch die gewählte Fangmethode [Tack et al., 2011]. Besser geeignet zur Untersuchung von Larven ist das *dragging*, bei dem ein Schlitten mit aufgespanntem Tuch über den Boden gestreift wird [Hagedorn, 2013]. Da Larven sich vom Ort der Eiablage kaum horizontal wegbewegen, bilden sich außerdem fokal große Larvenherde aus, welche leicht verpasst werden können. Außerdem können Larven aufgrund ihrer

geringen Größe und ihrer durchsichtigen Morphologie schnell beim Absammeln vom Tuch übersehen werden.

Es muss hervorgehoben werden, dass die Analyse von Larven nicht von vorrangigem Interesse in dieser Studie war. So stellen ungesogene Larven selbst, obschon sie für die Aufrechterhaltung der Zirkulation von Erregern von Bedeutung sind, für den Mensch primär eine geringe Gefahr dar. Sie bevorzugen zum einen Kleinsäuger als Wirt, zum anderen ist aufgrund der sehr niedrigen Wahrscheinlichkeit einer transovariellen Transmission von Borrelien und FSME von einer geringen Infektionsrate in Larven und damit von einer geringeren Infektionsgefahr bei einem Larvenstich auszugehen [Bellet-Edimo et al., 2005; Süss, 2011]. *A. phagocytophilum* wird nicht transovariell übertragen, sodass bezüglich dieses Erregers die Analyse von Larven keinen Stellenwert besitzt [Dunning Hotopp et al., 2006].

E.2 Erregerprävalenz in *Ixodes ricinus*

Das Risiko einer Infektion mit zeckenübertragenen Erkrankungen wird nicht allein von der Zahl wirtssuchender Zecken, sondern vielmehr auch von der Prävalenz der Pathogene, die sie tragen, bestimmt.

E.2.1 Prävalenz von FSMEV RNA

Die FSMEV-Prävalenz in Zecken wurde mittels einer nach Klaus modifizierten Real-time PCR nach Schwaiger und Cassinotti ermittelt. Diese PCR erlaubt den spezifischen Nachweis von FSMEV aller drei Subtypen [Schwaiger & Cassinotti, 2003]. Der darin eingeschlossene Nachweis des 16s rRNA-Gens konnte dabei die Qualität der Aufreinigung eines zufällig gewählten Drittels der Proben bestätigen. Folglich erscheinen falsch-negative Ergebnisse durch fehlerhafte Nukleinsäure-Aufreinigung oder eine Inhibition der PCR durch Probenmaterial unwahrscheinlich. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen erbrachten erwartungsgemäße Resultate, sodass insgesamt von validen Ergebnissen ausgegangen werden kann.

Da keine Sequenzierung nachgewiesener FSME-Viren erfolgte, kann keine Aussage über deren Virulenz getroffen werden. Einige Autoren postulieren eine unterschiedliche Pathogenität verschiedener Stämme. Weil für das FSMEV bisher allerdings die molekulargenetischen Grundlagen der Virulenz noch nicht eindeutig identifiziert worden sind, sollten nach Dobler et al. alle Stämme als virulent gelten [Wallner et al.,

1996; McMinn, 1997; Gritsun et al., 2001; Dobler et al., 2012].

In dieser Arbeit wurden nur nüchterne Zecken untersucht. Einige Studien belegen jedoch höhere FSMEV-Prävalenzen in von Menschen abgesammelten, gesogenen Zecken, wobei als Ursache die Proliferation des FSMEV während des Saugaktes diskutiert wird [Bormane et al., 2004; Süss et al., 2004; Süss et al., 2006; Klaus et al., 2010c]. Unter der Annahme einer Virusproliferation könnte die reale FSMEV-Prävalenz in Zecken unserer Studie unterschätzt worden sein. Es ist folglich in Betracht zu ziehen, dass Zecken mit einer Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze der von uns verwendeten PCR dennoch infektiös sein könnten.

Insgesamt betrug die ermittelte FSMEV-Prävalenz, bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Zecken, 0,11% (KI [0,01%; 0,4%]) bei jeweils einem Positivbefund in jedem der beiden Bundesländer. Damit ist sie am unteren Ende der zwischen 0,1 bis 5% in Abhängigkeit des Zeckenstadiums variierenden Prävalenz in Europa einzuordnen [Süss, 2011]. Die FSMEV-Prävalenz in Zecken steigt mit der Entwicklung von der Larve zur adulten Zecke unter Voraussetzung der transstadialen Weitergabe des Virus, da für die Zecke bei jeder Blutmahlzeit ein Infektionsrisiko besteht und Adulte somit am häufigsten exponiert werden. Auf einen statistischen Vergleich der FSMEV-Prävalenz der Stadien wurde in dieser Arbeit aufgrund der geringen Zahl von nur zwei positiven Zecken verzichtet.

In Rheinland-Pfalz konnte erstmalig der Nachweis von FSMEV-RNA in Zecken erbracht werden. Die positiv getestete Nymphe wurde in Idar-Oberstein im Landkreis Birkenfeld gefangen. Innerhalb dieses Gebietes sind bislang auch die meisten autochthonen Erkrankungsfälle in Rheinland-Pfalz aufgetreten. Im Zeitraum von 2001 - 2011 wurden neun Fälle verzeichnet, wozu die für diesen Landkreis bestimmte Prävalenz von 0,12% infizierter Zecken gut passt [Robert Koch-Institut, 2012].

Bereits im Jahr 2000 war in Idar-Oberstein und auch im Stadtteil Mittelbollenbach, dem Fangort der FSMEV-positiven Zecke, eine Studie zur Prävalenz von FSME-Viren in *I. ricinus* an 998 Zecken durchgeführt worden. Damals gelang der Nachweis von FSMEV-RNA allerdings nicht [Süss et al., 2002; Pietsch et al., 2002]. Der genaue Sammelort jener Studie geht aus diesem Papier nicht hervor. Da FSMEV-Herde aber eng umschriebene Räume darstellen, ist es möglich, dass sie bei der früheren Sammlung verfehlt wurden.

Gleiches gilt auch für die übrigen sechs beprobten Fanggebiete in Idar-Oberstein.

Die Gesamtprävalenz von FSMEV in Nymphen aus dem Landkreis Birkenfeld betrug 0,15% und ist damit verglichen mit Befallsraten aus anderen, vom Robert Koch-Institut als Risikogebiet eingestuften Landkreisen gering. Süss et al. hatten in einer über sechs Jahre durchgeführten Studie in den Hochendemiegebieten Deutschlands, Bayern und Baden-Württemberg, bei der Sammlung von fast 22.000 ungesogenen Zecken Prävalenzen von 0 bis 1,4 bzw. 3,4% für Nymphen ermittelt [Süss et al., 2004]. Dagegen konnte in Thüringen, wo ähnliche FSME- Inzidenzen wie in Rheinland-Pfalz vorliegen, kein FSMEV in den Risikogebieten Jena und dem Saale-Holzland-Kreis bei einer Untersuchung von 1557 Zecken, welche im Zeitraum von 2008 - 2010 gesammelt wurden, nachgewiesen werden [Klaus et al., 2013; Robert Koch-Institut, 2015].

Derartige Vergleiche mit anderen Risikogebieten sind problematisch, da die Durchseuchungsrate mit FSME-Viren insgesamt gering ist und starken jährlichen Schwankungen unterliegt. Wie aus oben angegebenen Daten hervorgeht, konnte selbst in den beiden Hochendemiegebieten Deutschlands bei einigen Sammlungen kein FSMEV nachgewiesen werden [Süss et al., 2002]. Eine Sammlung über mehrere Jahre am gleichen Standort erscheint daher sinnvoll.

Im Landkreis Kusel, welcher sich in einiger Entfernung zum Landkreis Birkenfeld befindet, war keine der gesammelten 61 Zecken mit dem FSMEV infiziert. Dies ist mit der bisherigen Abwesenheit humaner FSME-Fälle in diesem Landkreis gut vereinbar [Robert Koch-Institut, 2015].

Im Saarpfalz-Kreis lag die FSMEV-Prävalenz mit einem FSMEV-positiven Weibchen, bezogen auf die Zahl aller adulten Zecken, bei 0,42%. Im Vergleich dazu waren in Bayern mit 0 bis 5,3% und in Baden-Württemberg mit 0 bis 4,8% der Adulten deutlich mehr Zecken mit dem FSMEV infiziert [Süss et al., 2004].

Der Fangort der FSMEV-positiven Zecke in Rohrbach befindet sich in ebender Region, auf die die Mehrzahl der im Saarland erworbenen Erkrankungen zurückgeführt wird. Von 2008 – 2011 wurden fünf im Saarpfalz-Kreis erworbene Fälle einer FSME gemeldet, was gut mit der FSMEV-Gesamtprävalenz von 0,12% in *I. ricinus* innerhalb dieses Landkreises vereinbar ist [Robert Koch-Institut, 2012].

Um auch hier ein Risikogebiet mit ähnlicher Inzidenz zum Vergleich heranzuziehen, wurde der Landkreis Marburg-Biedenkopf in Hessen betrachtet. Dort wurden 1010 Zecken im Jahr 2000 ohne positives Ergebnis untersucht [Süss et al., 2002].

Ohne Nachweis blieben auch die anderen fünf gewählten Fangorte im Raum St. Ingbert-Rohrbach, was ein gutes Beispiel für die fokale Verbreitung des FSMEV darstellt. Am Glashütter Weiher konnte dabei bereits in einer von Prof. Dr. Süss 2008 durchgeführten Sammlung kein FSMEV in nüchternen Zecken nachgewiesen werden [Süss, 2008]. Ebenso in Übereinstimmung mit genannter Sammlung wurde am Bostalstausee kein FSMEV-Naturherd gefunden, wobei die Zirkulation des FSMEV innerhalb dieses Gebietes in Anbetracht der geringen Stichprobenmenge unserer Sammlung von nur 23 Zecken nicht auszuschließen ist [Süss, 2008].

Im Landkreis Saarlouis, wo dagegen das Vorhandensein von FSMEV in Zecken durch Süss belegt werden konnte, wurde in dieser Arbeit keine FSMEV tragende Zecke gefunden [Süss et al., 1996]. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein Sammelort innerhalb dieses Landkreises beprobt, mit einer Stichprobenzahl von nur 100 *I. ricinus* Exemplaren. Eine eindeutige Aussage über die Virus-Prävalenz in dieser Region kann also nicht getroffen werden.

Zusammenfassend war es möglich, das aufgrund der aufgetretenen Fälle vermutete Vorhandensein von Naturherden im Saarpfalz-Kreis im Saarland und auch im Landkreis Birkenfeld in Rheinland-Pfalz zu bestätigen. Da das FSMEV innerhalb inhomogen verteilter, kleinräumiger Herde verbreitet ist, spiegelt die ermittelte Virusprävalenz jedoch nicht zwingend den tatsächlichen Befall der Zeckenpopulation in beiden Bundesländern wieder. Faktoren, welche zur Bildung eines Fokus beitragen wie beispielsweise die synchrone Aktivität von Larven und Nymphen, die die Weitergabe des FSMEV durch Co-feeding ermöglicht, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. Entsprechend wären ergänzende Untersuchungen sinnvoll.

Aktuell stellt die humane FSME-Inzidenz den wichtigsten Parameter der FSME-Überwachung dar, da sie am besten die Gefährdung des Menschen durch das FSMEV widerspiegelt. Dabei ist allerdings eine hohe Dunkelziffer durch häufig asymptomatische Verläufe anzunehmen. Außerdem macht es die Zahl Geimpfter schwierig die tatsächliche Infektionsgefahr abzuschätzen. Dabei sind aktuell, anders als zu Beginn dieser Arbeit, weitgehend stagnierende Impfquoten zu verzeichnen [Robert Koch-Institut, 2015].

Aus den genannten Gründen ist es sinnvoll, weitere Instrumente für das Monitoring klimasensitiver zeckenübertragener Erkrankungen heranzuziehen (siehe unten).

Der Nutzen von Zeckensammlungen liegt vor allem in der Bestätigung von

Naturherden. Außerdem ist die weitere Entwicklung der Herde vor dem Hintergrund des Klimawandels interessant, weshalb nachfolgende Zeckensammlungen an den gewählten Sammelorten erfolgen sollten. Ergebnisse der Zeckensammlung im Jahr 2012, welche nicht Gegenstand dieser Arbeit war, wurden an anderer Stelle veröffentlicht [Mehlhorn et al., 2015]. Die größten Schwierigkeiten beim Monitoring des FSMEV in *Ixodes ricinus* durch Untersuchung von Zecken im Saarland und in Rheinland-Pfalz stellen dabei die niedrige FSMEV-Prävalenz sowie das Auftreten in Mikrofokussen dar. Sie bedingt die Notwendigkeit der Sammlung einer großen Zahl an Zecken mit erheblichem personellem und finanziellem Aufwand.

Zur Abschätzung des FSME Risikos für den Menschen sind daher auch weitere ergänzende Untersuchungen, wie die serologische Überwachung von standorttreuen Wild- oder Nutztieren von Bedeutung. So konnte beispielsweise die Korrelation einer hohen Seroprävalenzrate von Rehwild mit einer hohen FSME-Inzidenz von Menschen belegt werden [Gerth et al., 1995; Achazi et al., 2011; Klaus et al., 2012].

Von Interesse wäre auch die phylogenetische Analyse der gefundenen FSME-Viren zur Eingruppierung der Erreger.

E.2.2 Prävalenz von Borrelien- und Anaplasmen-DNA

Mit Hilfe der modifizierten PCR nach Schwaiger et al. zum Nachweis von *B. burgdorferi sensu lato* können alle fünf gesichert humanpathogenen Genospezies, sowie *B. valaisiana* nachgewiesen werden [Schwaiger et al., 2001; Bingsohn et al., 2013]. Eine anschließende Sequenzierung wurde nicht durchgeführt. *B. valaisiana*, die dritthäufigste Genospezies in Europa, ist nur selten Verursacher manifester Borreliosen, woraus folgt, dass wahrscheinlich von einem Teil der von uns detektierten Borrelien in Zecken nur ein geringes Erkrankungsrisiko für den Menschen ausgeht [Stanek et al., 2012]. Die ebenfalls weniger humanpathogenen Genospezies *B. lusitaniae* und *B. bissettii* können mit der verwendeten PCR nicht ermittelt werden [Schwaiger et al., 2001]. Allerdings wurden beide bisher nur in wenigen Zecken europaweit und innerhalb Deutschlands nachgewiesen und sind daher im Bezug auf die Gesamtprävalenz der Borrelien von untergeordneter Bedeutung [Kurtenbach et al., 2001; Rauter & Hartung, 2005; Hildebrandt et al., 2010c].

Auch an den hochspezifischen Nachweis von *A. phagocytophilum* in nüchternen Zecken wurde keine Typisierung angeschlossen. Da mit der verwendeten PCR auch apathogene Stämme detektiert werden, kann folglich auch hier keine Aussage über

die Pathogenität der gefundenen Anaplasmen getroffen werden.

Die verwendeten Positiv- bzw. Negativkontrollen erbrachten stets regelrechte Ergebnisse. Außerdem stimmten die Ergebnisse der Duplex-PCR aller zehn Prozent der mittels Mono-PCR überprüften Ergebnisse mit denen der Duplex-PCR überein, so dass diese als gleichwertig zum Nachweis von *A. phagocytophilum* bzw. *B. burgorferi* s.l. angesehen werden können.

Borrelien-DNA konnte in 20% aller untersuchter Zecken nachgewiesen werden. Folglich besteht, im Saarland und in Rheinland-Pfalz zusammen genommen, beim Stich etwa jeder fünften Zecke die Möglichkeit der Übertragung von Borrelien. Eine definitive Aussage über das Risiko, eine Borreliose zu erwerben, kann hieraus nicht abgeleitet werden, da nicht jeder Stich einer infizierten Zecke zwangsläufig zu einer Übertragung des Erregers führt. So wurde eine Transmissionsrate von 26,7% in Folge des Stichs einer Borrelien-positiven Zecke in Deutschland bei einer 730 Probanden umfassenden Studie mit insgesamt ca. 11% infizierten Zecken bestimmt [Maiwald et al., 1998]. Ob es zu einer Infektion kommt, ist außerdem von der Pathogenlast der Zecke, der Dauer des Saugaktes und nicht zuletzt von der Suszeptibilität des Wirtes für ein Pathogen abhängig [Hubálek, Z. , 2009]. In der zuvor genannten Studie von Maiwald et al. stellte sich eine, zum damaligen Zeitpunkt aktuelle, Falldefinition der Centers for Disease Control (CDC)⁶ entsprechende Borreliose, in neun Fällen ein [Maiwald et al., 1998] .

Angesichts der ermittelten Borrelienprävalenz sollten also, da aktuell für Europa kein Impfstoff gegen Borreliose für den Menschen zugelassen ist, alternative präventive Maßnahmen, vorrangig zur Verhütung eines Zeckenstichs, ergriffen werden. So können zum Beispiel Zecken abwehrende Repellentien verwendet werden.

Für Europa berechneten Rauter und Hartung in einer Metaanalyse eine niedrigere mittlere Borrelienprävalenz von 13,6% auf Grundlage von zwischen 0 und 49,1% variierenden Infektionsraten in *I. ricinus* [Rauter & Hartung, 2005]. Deutschland, speziell Süddeutschland, war dabei neben Österreich, der Schweiz, Tschechien, der Slowakei und Slowenien eines der Länder mit den höchsten Infektionsraten, definiert als Regionen mit über 11% infizierten Nymphen bzw. über 20% infizierten adulten Zecken. Der Mittelwert der Infektionsraten von Nymphen und Adulten im Süden und Südwesten Deutschlands lag bei 17,5% respektive 25%. Dies entspricht in etwa der

⁶Gesundheitsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika

Zahl Borrelien-positiver Nymphen in dieser Studie von 17%. Adulte waren dagegen mit 30,5% überdurchschnittlich häufig infiziert. Wie für das FSMEV beschrieben, bleibt auch die Infektion mit Borrelien und Anaplasmen transstadial erhalten, so dass die Infektionsrate mit zunehmendem Stadium zumeist steigt [Rauter & Hartung, 2005; Franke et al., 2008; Silaghi et al., 2008; Schicht et al., 2011]. Eine signifikante Abhängigkeit der Infektionsrate von *I. ricinus* mit Borrelien vom Entwicklungsstadium der Zecken konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. In beiden Bundesländern waren signifikant mehr Adulte als Nymphen infiziert.

Das Geschlecht war hingegen unabhängig von der Infektionsrate. Etwa jeweils 30% der Zecken beider Geschlechter waren mit Borrelien infiziert. Vergleichsweise weniger Zecken waren der Metaanalyse von Rauter und Hartung (2005) zufolge in Europa im Mittel Träger von Borrelien, nämlich 18% der weiblichen bzw. 16,2% der männlichen Zecken. Dabei lag ebenfalls kein Zusammenhang von Geschlecht und Infektionsrate vor [Rauter & Hartung, 2005]. Die Datenlage diesbezüglich in Deutschland erscheint kontrovers. Männliche Zecken nehmen mehrmals kleinere Blutmahlzeiten zu sich, sodass einige Autoren vermuteten, dass hierdurch nicht ausreichend viele Borrelien zur Etablierung einer Infektion aufgenommen würden und hierin niedrigere Infektionsraten bei männlichen Zecken begründet sahen [Maetzel et al., 2005]. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von Kampen et al. welche, bei der Untersuchung von 205 Adulten, signifikant mehr infizierte männliche Zecken erbrachte [Kampen et al., 2004]. Bingsohn et al. wiederum fanden an einem Fangort signifikant mehr infizierte Weibchen, während sich an der Mehrzahl der Fangorte keine Abhängigkeit der Infektionsrate vom Geschlecht zeigte [Bingsohn et al., 2013]. Weitere Klärung über den Einfluss des Geschlechtes der Zecken auf die Infektionsrate müssen zukünftige Metaanalysen erbringen.

Aufgrund der Abhängigkeit der Infektionsrate vom Entwicklungsstadium der Zecken, wurden Adulte und Nymphen beim Vergleich der Borrelienprävalenz der beiden Bundesländer getrennt voneinander betrachtet. So war der Anteil Borrelien-positiver Nymphen mit etwa 20,1% in Rheinland-Pfalz signifikant größer als im Saarland, wo er 13,7% betrug. Hingegen war kein signifikanter Unterschied der Infektionsraten im Bezug auf adulte Zecken nachweisbar. Dieselben Ergebnisse resultierten bei Betrachtung der Nymphen bzw. Adulten der Sammelschwerpunkte allein, also des Landkreises Birkenfeld gegenüber dem Saarpfalz-Kreis.

Als Ursache der zwischen den Bundesländern differierenden Prävalenz könnte z.B.

unter anderem das, in dieser Studie nicht berücksichtigte, unterschiedliche räumliche Vorkommen kompetenter Wirtstiere in Erwägung gezogen werden. Die Infektionsrate wird allerdings im komplexen System zeckenübertragener Erkrankungen von multiplen Faktoren beeinflusst, sodass sich über den Ursprung der sich für Nymphen signifikant unterscheidenden Prävalenz, nur spekulieren lässt.

Nymphen gelten allgemein als Hauptüberträger der Borreliose. Diese These stützend konnte in mehreren Studien eine positive Korrelation der Nymphenabundanz mit der Inzidenz von Borreliosen beim Menschen beobachtet werden [Hubálek, Z. , 2009]. Die Borrelioseinzidenz in Rheinland-Pfalz überschritt seit Einführung der Meldepflicht auf Basis der Landesverordnungen die des Saarlandes [Robert Koch-Institut, SurvStat@RKI]. Auf Landkreisebene lag die Inzidenz des LK Birkenfeld über der des Saarpfalz-Kreises. Die höhere Fallzahl pro Einwohner in Rheinland-Pfalz bzw. im Landkreis Birkenfeld mag also sicher zum Teil auf die höhere Borrelienprävalenz in Nymphen zurückgehen. Es bestimmen aber auch weitere Faktoren, wie die Zeckenabundanz oder die Häufigkeit menschlicher Exposition gegenüber Zecken, die Höhe der Fallzahlen.

Auf den in dieser Arbeit erstellten Datensatz zur Prävalenz von *B. burgdorferi s.l.* in *I. ricinus* in Rheinland-Pfalz und im Saarland aufbauend, kann die Entwicklung der Borrelienprävalenz über einen längeren Zeitraum, parallel mit der Entwicklung der Fallzahlen, weiter verfolgt werden, um eine Veränderung des Risikos humaner Erkrankungen über die Zeit hinweg abschätzen zu können.

Um in Zukunft derartige Überwachungsmaßnahmen kosteneffektiver zu gestalten, wäre beispielsweise die Sammlung von Nymphen allein denkbar. In Anbetracht der Forschungsergebnisse von Schulz et al. zur saisonalen Aktivität von *I. ricinus* in Süddeutschland, welche einen Aktivitätsgipfel von Nymphen zwischen April bis Juni erbrachten, sollte zusätzlich eine auf diesen Zeitraum begrenzte Sammlung erwogen werden [Schulz et al., 2014]. Von Schulz et al. wurden dabei auch Gebiete nahe unserer Beprobungsstellen erfasst.

Nicht zuletzt vor dem Hintergrund der sich in Entwicklung befindlichen Impfstoffe wäre sicherlich auch die ergänzende Typisierung der Borrelien aufschlussreich, um die lokal zirkulierenden, prädominanten Spezies, bestimmen zu können.

Die Gesamtprävalenz von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* betrug 1,8%, also nur etwa ein Zehntel der Borrelienprävalenz. Adulte Zecken waren, wie dies auch von

anderen Studien berichtet wurde, signifikant häufiger befallen als Nymphen [Stuen et al., 2013]. Ursächlich hierfür ist, neben der häufigeren Exposition von Adulten, vermutlich auch die fehlende transovariable Übertragung von *A. phagocytophilum*. Entsprechend konnten in Larven keine Anaplasmen nachgewiesen werden, während 0,7% der Nymphen, sowie 5,8% der Adulten infiziert waren.

Allgemein zeigt die Prävalenz von *A. phagocytophilum* eine große räumliche Variabilität. So wurden in *I. ricinus* in Europa Prävalenzen zwischen $< 1\%$ und 20% ermittelt, in *I. scapularis* und *I. pacificus* in den USA lagen sie zwischen $< 1\%$ und 50% bzw. 10% [Stuen et al., 2013]. Die Ursachen dieser Variabilität sind vielschichtig. Besonders die Verfügbarkeit von Reservoirwirten, welche wiederum vom Habitat abhängig ist, ist dabei von Belang.

Verglichen mit den Ergebnissen weiterer Studien aus Deutschland ist eine Anaplasmenprävalenz von 1,8% als gering einzustufen (siehe Tabelle 4). Die wohl höchste bisher in Deutschland ermittelte Gesamtprävalenz von 17,4% (20/115) stammt aus einer 2008 durchgeführten Zeckensammlung im Saarland, genauer im LK Saarlouis und im Regionalverband Saarbrücken [Beelitz et al., 2012; Silaghi et al., 2012]. Auf eine hohe lokale Anaplasmenprävalenz in Zecken im Saarland wurde auch eine im Bundesdurchschnitt außergewöhnlich hohe Seroprävalenz von 14,9%, welche eine 2001 durchgeführte Untersuchung von 361 jungen Männern zum Zeitpunkt ihres Wehrdienstantritts erbrachte, zurückgeführt [Woessner et al., 2001a]. Im Gegensatz dazu waren in dieser Arbeit im Saarland nur 1,9% der Zecken mit Anaplasmen infiziert. Diese lokale Variabilität scheint die von anderen Autoren beschriebene fokale Ausbreitung von *A. phagocytophilum* zu bestätigen [Fingerle et al., 1999]. Möglicherweise sind die differierenden Prävalenzen aber auch auf eine von einigen Autoren beobachtete starke zwischenjährliche Variabilität zurückzuführen [Grzeszczuk & Stańczak, 2006; Schorn et al., 2011]. Allerdings konnte diese Annahme bei Betrachtung der an diese Arbeit angeschlossenen Folgestudie, welche die Daten der insgesamt zweijährigen Sammlung im Saarland umfasst, für die beprobten Gebiete nicht bestätigt werden [Mehlhorn et al., 2015].

Für eine fokale Verteilung von *A. phagocytophilum* im Saarland und in Rheinland-Pfalz spricht außerdem die Tatsache, dass an fünf von dreizehn Fangorten keine einzige *A. phagocytophilum*-positive Zecke gefunden wurde. Dies kann jedoch, ähnlich dem Vorkommen von FSME-Viren, auch der allgemein geringen Prävalenz der Anaplasmen geschuldet sein.

In Rheinland-Pfalz, wo bislang noch keine vergleichbaren Untersuchungen in Zecken durchgeführt worden waren, unterschied sich die Prävalenz von Anaplasmen, im Gegensatz zu der von Borrelien, sowohl für Adulte als auch für Nymphen nicht signifikant von der des Saarlandes (p -Wert = 0,74).

Eine fokale Verteilung von *A. phagocytophilum* vorausgesetzt, lässt sich von den Ergebnissen dieser Studie nicht auf die Prävalenz dieses Erregers im gesamten Saarland und Rheinland-Pfalz schließen. Es wären dazu vielmehr flächendeckende Untersuchungen mit höheren Stichprobenzahlen pro Ort angesichts der eher geringen Anaplasmenprävalenz notwendig.

Obschon der Nachweis von *A. phagocytophilum* in Zecken sowie auch die Seroprävalenzrate von 1,0 – 4,4% in der Normalbevölkerung auf die Gefahr einer Anaplasmosenose in Deutschland hinweist, ist bisher kein autochthoner Fall einer solchen bekannt geworden [von Wissmann et al., 2015].

Selbst einer hohen Prävalenz in Zecken von bis zu 9,4% in Bayern zum Trotz konnte dort bisher keine klinisch manifeste Anaplasmosenose nachgewiesen werden [Silaghi et al., 2012]. In einer aktuellen Studie in Bayern wurde zwar in einem Fall serologisch eine akute Infektion dokumentiert, Symptome zeigte betreffender Patient allerdings nicht. Die gesamte Seroprävalenzrate, welche durchgemachte Infektionen mit *A. phagocytophilum* umfasst, lag bei 7,5%. Die Autoren führten diese Ergebnisse auf eine geringe Humanpathogenität der in Bayern vorherrschenden Anaplasmenstämme zurück [von Wissmann et al., 2015]. Ähnliches könnte auch auf die bereits zuvor genannte Studie von Woessner et al. zutreffen [Woessner et al., 2001a]. Dabei serokonvertierten 6,4% der Männer, ohne Symptome einer Anaplasmosenose zu entwickeln, während des zehnmonatigen Wehrdienstes im LK Saarlouis. Allerdings handelte es sich dabei durchgehend um gesunde, wehrtaugliche Männer zwischen 18 und 29 Jahren [Woessner et al., 2001a].

Es verbleibt die Frage nach der Pathogenität der in dieser Studie detektierten Erreger und damit ihres Gefährdungspotentials. Von der Zahl infizierter Zecken allein lässt sich nicht auf das Infektionsrisiko schließen. Um unter anderem diese Fragen zu beantworten, wurden in den letzten Jahren mehrere molekulare Typisierungsmethoden entwickelt, die zumindest eine Einordnung der Genvarianten von *A. phagocytophilum* in Cluster ermöglichen, welche die Adaptation der Varianten an Reservoirwirte widerspiegeln. So konnte auch eine humanpathogene Genvariante von

A. phagocytophilum im Saarland basierend auf einer Analyse der 16S RNA in obiger Studie von Silaghi et al. nachgewiesen werden [Silaghi et al., 2012]. Aufgrund der großen Diversität von *A. phagocytophilum* bleibt dies weiterhin ein Gebiet der Forschung [Dugat et al., 2015]. Die ergänzende Typisierung der von uns nachgewiesenen Anaplasmenstämme könnte zur Beantwortung der Frage nach ihrer Pathogenität beitragen und außerdem die Möglichkeit eröffnen, zukünftig ihren Ursprung zu beleuchten.

Letztlich ist auch in Betracht zu ziehen, dass Anaplasmosen in Deutschland aufgrund der geringen öffentlichen Aufmerksamkeit nicht erkannt werden. Es sollte also nach jedem Zeckenstich im Saarland und in Rheinland-Pfalz auch an die Möglichkeit einer Anaplasmosen gedacht werden.

E.2.3 Koinfektionen

Eine Metaanalyse von Nieto und Foley erbrachte regional zwischen 0,1% und 28% variierende Koinfektionsraten von *B. burgdorferi s. l.* und *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* in Europa [Nieto & Foley, 2009]. Dabei zeigten sich lokal stark unterschiedliche Koinfektionsraten, für die Nieto et al. jedoch keine Erklärung finden konnten. In Analogie hierzu wurden in dieser Studie an vier Orten im Saarland, nicht aber in Rheinland-Pfalz, mit beiden bakteriellen Erregern infizierte Zecken nachgewiesen. Gegenüber der Gesamtkoinfektionsrate von 0,3% (5/1799) ergab sich für das Saarland allein eine Koinfektionsrate von 0,5% (5/930). Diese verhältnismäßig geringe Zahl liegt wahrscheinlich in der niedrigen Prävalenz von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* im Vergleich zu *B. burgdorferi s.l.* begründet. Um eine bessere statistische Aussagekraft bei einer derart geringen Anaplasmenprävalenz zu erzielen, wäre eine größere Stichprobenzahl pro Sammelort geeignet.

Entsprechend der Hypothese, dass die Infektion mit einem Pathogen die Infektion mit dem anderen begünstigt, müsste mit steigender Prävalenz der einzelnen Erreger auch die Zahl koinfizierter Zecken zunehmen. Da die Infektionsraten von Anaplasmen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bundesländern zeigten, während eine Infektion mit Borrelien in Rheinland-Pfalz signifikant häufiger war, wären höhere Koinfektionsraten in Rheinland-Pfalz zu erwarten gewesen. Umso erstaunlicher ist es, dass in Rheinland-Pfalz nicht eine mit Borrelien und Anaplasmen zugleich infizierte Zecke gefunden wurde.

Eine Studie an *I. scapularis* konnte die Unabhängigkeit der Transmissionsra-

ten von Borrelien und Anaplasmen voneinander durch den Nachweis belegen, dass Mäuse, ungeachtet einer vorbestehenden Infektion mit *A. phagocytophilum* oder *B. burgdorferi*, sich mit dem jeweils anderen Erreger infizierten. Zudem bestand auch kein Unterschied der Transmissionsraten beider Erreger auf Mäuse durch eine koinfizierte im Vergleich zu einer einfach infizierten Zecke [Levin & Fish, 2000]. Ob dies auch auf die Infektion von *I. ricinus* zutrifft oder ob die Infektion mit einem Erreger die Infektion mit weiteren Erregern erleichtert oder erschwert, ist noch nicht ausreichend erforscht.

Unter der Annahme, dass Adulte, die bereits zwei Blutmahlzeiten eingenommen haben, häufiger von Koinfektionen betroffen sind als die vorangehenden Stadien, waren in dieser Studie ausschließliche Adulte Träger beider bakterieller Erreger. Auch in vorangegangenen europäischen Studien waren vorrangig Adulte koinfiziert [Nieto & Foley, 2009].

Interessanterweise waren beide FSMEV-positiven Zecken gleichzeitig auch Träger von Borrelien, was durch die vorliegende hohe Borrelienprävalenz von 17 bzw. 22,7% bedingt sein kann.

Studien haben gezeigt, dass Koinfektionen mit Borrelien und FSME-Viren, welche auch aus Deutschland berichtet wurden, in Folge eines einzigen Zeckenstichs beim Menschen möglich sind [Broker, 2012]. Anfänglich können beide Erreger zu unspezifischen Beschwerden mit damit einhergehenden diagnostischen Schwierigkeiten führen. Dem kommt eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung zu, da beide Erkrankungen nachfolgend einen letalen Verlauf nehmen können. Ihr Nachweis sollte daher, obgleich die Rate an Koinfektionen in Zecken gering war, Anlass sein, multiple Infektionen nach einem Zeckenstich mit atypischer Symptomatik in Betracht zu ziehen.

F Literaturverzeichnis

- [Achazi et al., 2011] Achazi, K.; Ruzek, D.; Mantke, O. D.; Schlegel, M.; Ali, H. S.; Wenk, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Ohlmeyer, L.; R  he, F.; Vor, T.; Kiffner, C.; Kallies, R.; Ulrich, R.; Niedrig, M. (2011). Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(6):641–647.
- [Bakken & Dumler, 2000] Bakken, J. S.; Dumler, J. S. (2000). Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2):554–560.
- [Bakken & Dumler, 2006] Bakken, J. S.; Dumler, J. S. (2006). Clinical Diagnosis and Treatment of Human Granulocytotropic Anaplasmosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1):236–247.
- [Bakken et al., 2006] Bakken, J. S.; Folk, S. M.; Paddock, C. D.; Bloch, K. C.; Krusell, A.; Sexton, D. J.; Buckingham, S. C.; Marshall, G. S.; Storch, G. A.; Dasch, G. A.; McQuiston, J. H.; Swerdlow, D. L.; Dumler, S. J.; Nicholson, W. L.; Walker, D. H.; Ereemeeva, M. E.; A, O. C. (2006). Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis—United States. *MMWR Recomm Rep*, 55:1–27.
- [Bakken et al., 1996] Bakken, J. S.; Krueth, J. K.; Lund, T.; Malkovitch, D.; Asanovich, K.; Dumler, J. S. (1996). Exposure to Deer Blood May Be a Cause of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 23(1):198.
- [Beelitz et al., 2012] Beelitz, P.; Schumacher, S.; Marholdt, F.; Pfister, K.; Silaghi, C. (2012). Untersuchungen zur Pr  valenz von Babesia canis canis in Auwaldzecken (Dermacentor reticulatus) im Saarland. Studies on the prevalence of Babesia canis canis in marsh ticks (Dermacentor reticulatus) in the Saarland. *Berl. M  nch. Tier  rztl. Wschr.*, 4(3-4):168–171.
- [Bellet-Edimo et al., 2005] Bellet-Edimo, R.; Betschart, B.; Gern, L. (2005). Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmission of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks. *Bull. de la Soci  t   Neuch  teloise des Sciences Naturelles*, 128:117–125.

- [Biernat et al., 2014] Biernat, B.; Karbowiak, G.; Werszko, J.; Stańczyk, J. (2014). Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland. *Experimental and Applied Acarology*, 64(4):543–551.
- [Bingsohn et al., 2013] Bingsohn, L.; Beckert, A.; Zehner, R.; Kuch, U.; Oehme, R.; Kraiczy, P.; Amendt, J. (2013). Prevalences of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* populations of the Rhine-Main region, Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 4(3):207–213.
- [Blanco & Oteo, 2002] Blanco, J. R.; Oteo, J. A. (2002). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(12):763–772.
- [Boom et al., 1990] Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim-van Dillen, P. M.; van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28(3):495–503.
- [Bormane et al., 2004] Bormane, A.; Lucenko, I.; Duks, A.; Mavtchoutko, V.; Ranka, R.; Salmina, K.; Baumanis, V. (2004). Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993–2002. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293:36–47.
- [Broker, 2012] Broker, M. (2012). Following a tick bite: double infections by tick-borne encephalitis virus and the spirochete *Borrelia* and other potential multiple infections. *Zoonoses Public Health*, 59(3):176–180.
- [Burke & Monath, 2001] Burke, D.; Monath, T. (2001). Flaviviruses. *Fields virology*, 1:1043–1125.
- [Casjens et al., 2010] Casjens, S. R.; Eggers, C. H.; Schwartz, I. (2010). *Borrelia* genomics: chromosome, plasmids, bacteriophages and genetic variation. *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis*. Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, United Kingdom, S. 27–53.
- [CDC: www.cdc.gov] CDC: www.cdc.gov. Anaplasmosis: Statistics and Epidemiology. abgerufen am 28.04.2014.

- [Chen et al., 1994] Chen, S. M.; Dumler, J. S.; Bakken, J. S.; Walker, D. H. (1994). Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3):589–595.
- [Clegg, 1995] Clegg, R. M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(1):103 – 110.
- [Clopper & Pearson, 1934] Clopper, C. J.; Pearson, E. S. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4):404–413.
- [Courtney et al., 2004] Courtney, J. W.; Kostelnik, L. M.; Zeidner, N. S.; Massung, R. F. (2004). Multiplex real-time pcr for detection of anaplasma phagocytophilum and borrelia burgdorferi. *J Clin Microbiol*, 42(7):3164–3168.
- [Crippa et al., 2002] Crippa, M.; Rais, O.; Gern, L. (2002). Investigations on the Mode and Dynamics of Transmission and Infectivity of Borrelia burgdorferi Sensu Stricto and Borrelia afzelii in Ixodes ricinus Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2(1):3–9.
- [Daniel et al., 2003] Daniel, M.; Danielová, V.; Kříž, B.; Jirsa, A.; Nožička, J. (2003). Shift of the tick Ixodes ricinus and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(5):327–328.
- [Danielová & Holubová, 1991] Danielová, V.; Holubová, J. (1991). Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks. *Modern acarology*, 2:7–10.
- [Darai et al., 2012] Darai, G.; Handermann, M.; Sonntag, H.-G.; Zöller, L. (2012). *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Springer-Verlag. 4. Auflage.
- [Dautel et al., 2008] Dautel, H.; Dippel, C.; Kämmer, D.; Werkhausen, A.; Kahl, O. (2008). Winter activity of Ixodes ricinus in a Berlin forest. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, Supplement 1:50 – 54. Proceedings IX. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases (formerly IPS) March 15-17, 2007.

- [Dautel et al., 2006] Dautel, H.; Dippel, C.; Oehme, R.; Hartelt, K.; Schettler, E. (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296 Suppl 40:149–156.
- [Demicheli et al., 2009] Demicheli, V.; Debalini, M. G.; Rivetti, A. (2009). Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *The Cochrane Library*.
- [Dobler et al., 2012] Dobler, G.; Gniel, D.; Petermann, R.; Pfeffer, M. (2012). Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr*, 162(11-12):230–238.
- [Dobler et al., 2011] Dobler, G.; Hufert, F.; Pfeffer, M.; Essbauer, S. (2011). Tick-Borne Encephalitis: From Microfocus to Human Disease. In Mehlhorn, H., Ed., *Progress in Parasitology*, Bd. 2 of *Parasitology Research Monographs*, S. 323–331. Springer Berlin Heidelberg.
- [Dugat et al., 2015] Dugat, T.; Lagrée, A.-C.; Maillard, R.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(61).
- [Dumler et al., 2001] Dumler, J. S.; Barbet, A. F.; Bekker, C. P.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(60):2145–2165.
- [Dumler et al., 2005] Dumler, J. S.; Choi, K.-S.; Garcia-Garcia, J. C.; Barat, N. S.; Scorpio, D. G.; Garyu, J. W.; Grab, D. J.; Bakken, J. S. (2005). Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12):1828.

- [Dumler et al., 2007] Dumler, J. S.; Madigan, J. E.; Pusterla, N.; Bakken, J. S. (2007). Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 45 Suppl 1:45–51.
- [Dunning Hotopp et al., 2006] Dunning Hotopp, J. C.; Lin, M.; Madupu, R.; Crabtree, J.; Angiuoli, S. V.; Eisen, J. A.; Eisen, J.; Seshadri, R.; Ren, Q.; Wu, M.; Utterback, T. R.; Smith, S.; Lewis, M.; Khouri, H.; Zhang, C.; Niu, H.; Lin, Q.; Ohashi, N.; Zhi, N.; Nelson, W.; Brinkac, L. M.; Dodson, R. J.; Rosovitz, M. J.; Sundaram, J.; Daugherty, S. C.; Davidsen, T.; Durkin, A. S.; Gwinn, M.; Haft, D. H.; Selengut, J. D.; Sullivan, S. A.; Zafar, N.; Zhou, L.; Benahmed, F.; Forberger, H.; Halpin, R.; Mulligan, S.; Robinson, J.; White, O.; Rikihisa, Y.; Tettelin, H. (2006). Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.*, 2(2).
- [Ecker et al., 1999] Ecker, M.; Allison, S. L.; Meixner, T.; Heinz, F. X. (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia.”, journal = ”Journal of General Virology. 80(1):179–185.
- [Eis et al., 2011] Eis, D.; Helm, D.; Laußmann, D.; Stark, K. (2011). Klimawandel und Gesundheit-ein Sachstandsbericht. Hrsg. Robert Koch-Institut, Berlin.
- [Eistetter et al., 1998] Eistetter, S.; Kimmig, P.; Oehme, R. (1998). Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME in Baden-Württemberg. *Bundesgesundheitsblatt*, 41(2):62–66.
- [EU Kommission, 2009] EU Kommission (2009). Auswirkungen des Klimawandels auf die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen. Begleitpapier für das Weissbuch: Anpassung an den Klimawandel . *Begleitpapier für das Weissbuch: Anpassung an den Klimawandel*.
- [European Centre for Disease Prevention & Control., 2012] European Centre for Disease Prevention; Control. (2012). Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries.
- [European concerted action on Lyme Borreliosis, www.eucalb.com] European concerted action on Lyme Borreliosis, www.eucalb.com. Abschnitt: BIOLOGY: The Tick: Introduction,. abgerufen am 10.04.2015.

- [Fingerle et al., 1997] Fingerle, V.; Goodman, J. L.; Johnson, R. C.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G.; Wilske, B. (1997). Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol*, 35(12):3244–3247.
- [Fingerle et al., 1999] Fingerle, V.; Munderloh, U.; Liegl, G.; Wilske, B. (1999). Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Medical microbiology and immunology*, 188(3):145–149.
- [Fingerle et al., 2008] Fingerle, V.; Schulte-Spechtel, U. C.; Ruzic-Sabljić, E.; Leonhard, S.; Hofmann, H.; Weber, K.; Pfister, K.; Strle, F.; Wilske, B. (2008). Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. . *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3–4):279 – 290.
- [Fisher, 1925] Fisher, R. (1925). *Statistical methods for research workers*. Edinburgh Oliver & Boyd.
- [Foley et al., 1999] Foley, J. E.; Crawford-Miksza, L.; Dumler, J. S.; Glaser, C.; Chae, J.-S.; Yeh, E.; Schnurr, D.; Hood, R.; Hunter, W.; Madigan, J. E. (1999). Human Granulocytic Ehrlichiosis in Northern California: Two Case Descriptions with Genetic Analysis of the Ehrlichiae. *Clinical Infectious Diseases*, 29(2):388–392.
- [Franke et al., 2010] Franke, J.; Fritzsche, J.; Tomaso, H.; Straube, E.; Dorn, W.; Hildebrandt, A. (2010). Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Applied and environmental microbiology*, 76(20):6829–6836.
- [Franke et al., 2011] Franke, J.; Hildebrandt, A.; Meier, F.; Straube, E.; Dorn, W. (2011). Prevalence of Lyme Disease Agents and Several Emerging Pathogens in Questing Ticks From the German Baltic Coast. *Journal of Medical Entomology*, 48(2):441–444.
- [Franke et al., 2008] Franke, J.; Kipp, S.; Flügel, C.; Dorn, W. (2008). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sl in ticks feeding on humans in Thuringia/Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 298:188–192.

- [Förster, 1948] Förster, T. (1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, Bd. 437 of *Annalen der Physik*, S. 55–75. WILEY-CHV Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [Gern, 2005] Gern, L. (2005). Die Biologie der Ixodes ricinus Zecke. *Therapeutische Umschau*, 62(11):707–712.
- [Gerth et al., 1995] Gerth, H. J.; Grimshandl, D.; Stage, B.; Döller, G.; Kunz, C. (1995). Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol. Infect.*, 115(2):355–365.
- [Ginsberg & Ewing, 1989] Ginsberg, H.; Ewing, C. (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, Ixodes dammini, and lone-star ticks, Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 7(4):313–322.
- [Golovljova et al., 2008] Golovljova, I.; Katargina, O.; Geller, J.; Tallo, T.; Mittzenkov, V.; Vene, S.; Nemirov, K.; Kutsenko, A.; Kilosanidze, G.; Vasilenko, V.; Plyusnin, A.; Åke Lundkvist (2008). Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian {TBEV} subtype. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, Supplement 1:108 – 120. Proceedings IX. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases (formerly IPS) March 15-17, 2007.
- [Gray, 1998] Gray, J. (1998). Review The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental & Applied Acarology*, 22(5):249–258.
- [Gray et al., 2009] Gray, J. S.; Dautel, H.; Estrada-Peña, A.; Kahl, O.; Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009:593232. 19277106[pmid].
- [Gritsun et al., 2001] Gritsun, T. S.; Desai, A.; Gould, E. A. (2001). The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations. *J. Gen. Virol.*, 82:1667–1675.
- [Grzeszczuk & Stańczak, 2006] Grzeszczuk, A.; Stańczak, J. (2006). Highly Variable Year-to-Year Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus Ticks

- in Northeastern Poland: A 4-Year Follow-up. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1):309–311.
- [Gäumann et al., 2011] Gäumann, R.; Růžek, D.; Mühlemann, K.; Strasser, M.; Beuret, C. M. (2011). Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *Journal of Medical Virology*, 83(5):853–863.
- [Hagedorn, 2013] Hagedorn, P. (2013). *Untersuchung von Zecken als Marker für die Gefährdung durch von ihnen übertragene Krankheiten. Die Prävalenz von Borrelien, Babesien, Rickettsien und Anaplasmen in Ixodes ricinus, Dermacentor reticulatus und Haemaphysalis concinna*. dissertation, Freie Universität Berlin.
- [Haglund et al., 1996] Haglund, M.; Forsgren, M.; Lindh, G.; Lindquist, L. (1996). A 10-Year Follow-Up Study of Tick-Borne Encephalitis in the Stockholm Area and a Review of the Literature: Need for a Vaccination Strategy. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 28(3):217–224.
- [Hartelt et al., 2004] Hartelt, K.; Oehme, R.; Frank, H.; Brockmann, S. O.; Hassler, D.; Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293, Supplement 37:86 – 92. Proceedings of the {VII} International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases.
- [Heinz et al., 2007] Heinz, F. X.; Holzmann, H.; Essl, A.; Kundi, M. (2007). Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25(43):7559 – 7567.
- [Herron et al., 2005] Herron, M. J.; Ericson, M. E.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G. (2005). The Interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, Endothelial Cells, and Human Neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063(1):374–382.
- [Higuchi et al., 1992] Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat Biotech*, 10(4):413–417.

- [Hildebrandt et al., 2011] Hildebrandt, A.; Fritzsche, J.; Franke, J.; Sachse, S.; Dorn, W.; Straube, E. (2011). Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(5):533–537.
- [Hildebrandt et al., 2010a] Hildebrandt, A.; Krämer, A.; Sachse, S.; Straube, E. (2010a). Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks and tick-borne diseases*, 1(1):52–56.
- [Hildebrandt et al., 2010b] Hildebrandt, A.; Pauliks, K.; Sachse, S.; Straube, E. (2010b). Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(9):831–837.
- [Hildebrandt et al., 2010c] Hildebrandt, A.; Pauliks, K.; Sachse, S.; Straube, E. (2010c). Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10(9):831–837.
- [Hildebrandt et al., 2003] Hildebrandt, A.; Schmidt, K. H.; Wilske, B.; Dorn, W.; Straube, E.; Fingerle, V. (2003). Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22(6):364–367.
- [Holland et al., 1991] Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16):7276–7280. 1871133[pmid].
- [Holzmann et al., 2009] Holzmann, H.; Aberle, S. W.; Stiasny, K.; Werner, P.; Mischak, A.; Zainer, B.; Netzer, M.; Koppi, S.; Bechter, E.; Heinz, F. X. (2009). Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10):1671.
- [Horowitz et al., 1998a] Horowitz, H. W.; Aguero-Rosenfeld, M.; Dumler, J. S.; McKenna, D. F.; Hsieh, T.-c.; Wu, J.; Schwartz, I.; Wormser, G. P. (1998a). Reinfection with the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Annals of Internal Medicine*, 129(6):461–463.

- [Horowitz et al., 1998b] Horowitz, H. W.; Kilchevsky, E.; Haber, S.; Agüero-Rosenfeld, M.; Kranwinkel, R.; James, E. K.; Wong, S. J.; Chu, F.; Liveris, D.; Schwartz, I. (1998b). Perinatal Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *New England Journal of Medicine*, 339(6):375–378. PMID: 9691104.
- [Hubálek, Z. , 2009] Hubálek, Z. (2009). Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.*, 37:31–50.
- [Huhn et al., 2014] Huhn, C.; Winter, C.; Wolfspurger, T.; Wuppenhorst, N.; Strašek Smrdel, K.; Skuballa, J.; Pfaffle, M.; Petney, T.; Silaghi, C.; Dyachenko, V.; Pantchev, N.; Straubinger, R. K.; Schaarschmidt-Kiener, D.; Ganter, M.; Aardema, M. L.; von Loewenich, F. D. (2014). Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS ONE*, 9(4):e93725.
- [Huppertz et al., 1999] Huppertz, H. I.; Bohme, M.; Standaert, S. M.; Karch, H.; Plotkin, S. (1999). Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 18(10):697–703.
- [Hübler, 2008] Hübler, M. (2008). Sozio-ökonomische Bewertung von Gesundheitseffekten des Klimawandels in Deutschland. In *Warnsignal Klima: Gesundheitsrisiken*, S. 299–306. Hamburg: Wiss. Auswertungen.
- [Ismail et al., 2010] Ismail, N.; Bloch, K. C.; McBride, J. W. (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.*, 30(1):261–292.
- [Jaaskelainen et al., 2006] Jaaskelainen, A. E.; Tikkakoski, T.; Uzcategui, N. Y.; Alekseev, A. N.; Vaheri, A.; Vapalahti, O. (2006). Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerging Infect. Dis.*, 12(10):1568–1571.
- [Jaenson et al., 2012] Jaenson, T. G.; Jaenson, D. G.; Eisen, L.; Petersson, E.; Lindgren, E. (2012). Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors*, 5:8.
- [Jereb et al., 2012] Jereb, M.; Pecaver, B.; Tomazic, J.; Muzlovic, I.; Avsic-Zupanc, T.; Premru-Srsen, T.; Levicnik-Stežinar, S.; Karner, P.; Strle, F. (2012). Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerging Infect. Dis.*, 18(8):1354–1357.

- [Jin et al., 2012] Jin, H.; Wei, F.; Liu, Q.; Qian, J. (2012). Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 12(4):269–274.
- [Kaiser, 1999] Kaiser, R. (1999). The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain*, 122 (Pt 11):2067–2078.
- [Kaiser, 2011] Kaiser, R. (2011). Long-term prognosis of patients with primary myelitic manifestation of tick-borne encephalitis. *Der Nervenarzt*, 82(8):1020–1025.
- [Kaiser, 2012] Kaiser, R. (2012). Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wien Med Wochenschr*, 162(11-12):239–243.
- [Kampen et al., 2004] Kampen, H.; Rötzel, D. C.; Kurtenbach, K.; Maier, W. A.; Seitz, H. M. (2004). Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3):1576–1582.
- [Kampen & Werner, 2011] Kampen, H.; Werner, D. (2011). Arthropod Vectors and Their Growing Importance in Europe. In Mehlhorn, H., Ed., *Progress in Parasitology*, Bd. 2 of *Parasitology Research Monographs*, S. 259–282. Springer Berlin Heidelberg.
- [Kim et al., 2008] Kim, S. Y.; Yun, S. M.; Han, M. G.; Lee, I. Y.; Lee, N. Y.; Jeong, Y. E.; Lee, B. C.; Ju, Y. R. (2008). Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(1):7–13.
- [King et al., 2011] King, A. M.; Adams, M. J.; Lefkowitz, E. J. (2011). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Bd. 9. Elsevier.
- [Kipp et al., 2006] Kipp, S.; Goedecke, A.; Dorn, W.; Wilske, B.; Fingerle, V. (2006). Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. *International Journal of Medical Microbiology*, 296:125–128.

- [Klaus et al., 2012] Klaus, C.; Beer, M.; Saier, R.; Schau, U.; Moog, U.; Hoffmann, B.; Diller, R.; Süss, J. (2012). Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus—epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(1):27–37.
- [Klaus et al., 2010a] Klaus, C.; Hoffmann, B.; Beer, M.; Müller, W.; Stark, B.; Bader, W.; Stiasny, K.; Heinz, F. X.; Süss, J. (2010a). Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. *Ticks and tick-borne diseases*, 1(3):141–144.
- [Klaus et al., 2010b] Klaus, C.; Hoffmann, B.; Beer, M.; Müller, W.; Stark, B.; Bader, W.; Stiasny, K.; Heinz, F. X.; Süss, J. (2010b). Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1(3):141 – 144.
- [Klaus et al., 2010c] Klaus, C.; Hoffmann, B.; Hering, U.; Mielke, B.; Sachse, K.; Beer, M.; Süss, J. (2010c). Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16(3):238–244.
- [Klaus et al., 2013] Klaus, C.; Horugel, U.; Hoffmann, B.; Beer, M. (2013). Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet. Microbiol.*, 163(3-4):368–372.
- [Kohn et al., 2011] Kohn, B.; Silaghi, C.; Galke, D.; Arndt, G.; Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res. Vet. Sci.*, 91(1):71–76.
- [Korenberg & Kovalevskii, 1999] Korenberg, E. I.; Kovalevskii, Y. V. (1999). Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralbl. Bakteri-ol.*, 289(5-7):525–539.
- [Kreuwel & Verwimp, 2004] Kreuwel, H.; Verwimp, E. (2004). Device and method for mixing magnetic particles with a fluid. US Patent 6,764,859.

- [Kupca, 2009] Kupca, A. M. (2009). *Ixodes ricinus (Ixodidae): Saisonale Aktivität und natürliche Infektionen mit dem FSME-Virus an ausgewählten Orten in Bayern*. PhD thesis, lmu.
- [Kurtenbach et al., 2001] Kurtenbach, K.; De Michelis, S.; Sewell, H. S.; Etti, S.; Schafer, S. M.; Hails, R.; Collares-Pereira, M.; Santos-Reis, M.; Hanincova, K.; Labuda, M.; Bormane, A.; Donaghy, M. (2001). Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10):4926–4929.
- [Labuda et al., 1996] Labuda, M.; Austyn, J. M.; Zuffova, E.; Kozuch, O.; Fuchsberger, N.; Lysy, J.; Nuttall, P. A. (1996). Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 219(2):357–366.
- [Labuda et al., 1993] Labuda, M.; Nuttall, P. A.; Kozuch, O.; Eleckova, E.; Williams, T.; Zuffova, E.; Sabo, A. (1993). Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*, 49(9):802–805.
- [Lawrence D. Brown, 2001] Lawrence D. Brown, T. Tony Cai, A. D. (2001). Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 16(2):101–117.
- [Lee et al., 1993] Lee, L. G.; Connell, C. R.; Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation pcr with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 21(16):3761–3766. 8367293[pmid].
- [Leutenegger et al., 1999] Leutenegger, C. M.; Pusterla, N.; Mislin, C. N.; Weber, R.; Lutz, H. (1999). Molecular Evidence of Coinfection of Ticks with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 37(10):3390–3391.
- [Levin & Fish, 2000] Levin, M. L.; Fish, D. (2000). Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. *Infect. Immun.*, 68(4):2183–2186.
- [Lin & Rikihisa, 2003] Lin, M.; Rikihisa, Y. (2003). *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.*, 71(9):5324–5331.

- [Lindenbach & Rice, 2003] Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.*, 59:23–61.
- [Lindgren et al., 2006] Lindgren, E.; Jaenson, T. G.; Organization, W. H.; others (2006). Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures.
- [Lundkvist et al., 2001] Lundkvist, Å.; Vene, S.; Golovljova, I.; Mavtchoutko, V.; Forsgren, M.; Kalnina, V.; Plyusnin, A. (2001). Characterization of tick-borne encephalitis virus from latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *Journal of medical virology*, 65(4):730–735.
- [Maetzel et al., 2005] Maetzel, D.; Maier, W. A.; Kampen, H. (2005). Borrelia burgdorferi infection prevalences in questing Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitology research*, 95(1):5–12.
- [Maiwald et al., 1998] Maiwald, M.; Oehme, R.; March, O.; Petney, T. N.; Kimmig, P.; Naser, K.; Zappe, H. A.; Hassler, D.; von Knebel Doeberitz, M. (1998). Transmission risk of Borrelia burgdorferi sensu lato from Ixodes ricinus ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol. Infect.*, 121(1):103–108.
- [Mátlová et al., 1996] Mátlová, L.; Halouzka, J.; Juřicová, Z.; Hubálek, Z.; others (1996). Comparative experimental infection of Ixodes ricinus and reticulatus Acari (Dermacentor2085: Ixodidae) with Borrelia burgdorferi sensu lato. *Folia Parasitologica*, 43:159–160.
- [Maximova et al., 2009] Maximova, O. A.; Faucette, L. J.; Ward, J. M.; Murphy, B. R.; Pletnev, A. G. (2009). Cellular inflammatory response to flaviviruses in the central nervous system of a primate host. *J.Histochem.Cytochem.*, 57(10):973–989.
- [McMinn, 1997] McMinn, P. (1997). The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *Journal of General Virology*, 78(11):2711–2722.
- [Mehlhorn & Mehlhorn, 2009] Mehlhorn, B.; Mehlhorn, H. (2009). *Zecken auf dem Vormarsch!* Düsseldorf University Press, Düsseldorf.
- [Mehlhorn et al., 2015] Mehlhorn, H.; Mehlhorn, T.; Müller, M.; Vogt, M.; Rissland, J. (2015). Tick survey for prevalent pathogens in peri-urban recreation sites in Saarland and Rhineland-Palatinate (Germany). *Parasitol. Res.*

- [Mejlon & Jaenson, 1997] Mejlon, H.; Jaenson, T. G. (1997). Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*, 21(12):747–754.
- [Minol & Gassen, 2003] Minol, S.; Gassen, H. G. (2003). *Chemische Technik: Prozesse und Produkte*, Bd. 2, Kap. 7, S. 1–32. WILEY-CHV Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [Moshkin et al., 2009] Moshkin, M. P.; Novikov, E. A.; Tkachev, S. E.; Vlasov, V. V. (2009). Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health. *Bioessays*, 31(6):620–628.
- [Mott et al., 2002] Mott, J.; Rikihisa, Y.; Tsunawaki, S. (2002). Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. *Infection and immunity*, 70(3):1359–1366.
- [Mullis, 1985] Mullis, K. B. (1985). Polymerase-Kettenreaktion. US Patent 4,683,202.
- [Müller & Ansorg, 1987] Müller, K.; Ansorg, R. (1987). Serologische Untersuchungen zum Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Risiko im Saarland. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 264(1-2):201–207.
- [Nieto & Foley, 2009] Nieto, N. C.; Foley, J. E. (2009). Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9(1):93–102.
- [Nigrovic & Thompson, 2007] Nigrovic, L. E.; Thompson, K. M. (2007). The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiol. Infect.*, 135(1):1–8.
- [Oehme et al., 2002] Oehme, R.; Hartelt, K.; Backe, H.; Brockmann, S.; Kimmig, P. (2002). Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291 Suppl 33:22–29.
- [Ogden et al., 2013] Ogden, N.; Artsob, H. and Margos, G.; Tsao, J. (2013). Non-rickettsial tick-borne bacteria and the diseases they cause. In *Biology of ticks*, Bd. 2, S. 278 –312. Oxford University Press, New York.

- [Overzier et al., 2013] Overzier, E.; Pfister, K.; Thiel, C.; Herb, I.; Mahling, M.; Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: comparison of prevalences and partial 16S rRNA gene variants in urban, pasture, and natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(5):1730–1734.
- [Park et al., 2003] Park, J.; Choi, K. S.; Dumler, J. S. (2003). Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect. Immun.*, 71(7):4018–4025.
- [Petney et al., 2011] Petney, T.; Robbins, R.; Guglielmone, A.; Apanaskevich, D.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.; Shao, R. (2011). A Look at the World of Ticks. In Mehlhorn, H., Ed., *Progress in Parasitology*, Bd. 2 of *Parasitology Research Monographs*, S. 283–296. Springer Berlin Heidelberg.
- [Petrovec et al., 1997] Petrovec, M.; Lotric Furlan, S.; Zupanc, T. A.; Strle, F.; Brouqui, P.; Roux, V.; Dumler, J. S. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 35(6):1556–1559.
- [Pichon et al., 2006] Pichon, B.; Kahl, O.; Hammer, B.; Gray, J. S. (2006). Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 6(4):382–387.
- [Piesman & Schwan, 2010] Piesman, J.; Schwan, T. G. (2010). Ecology of borreliæ and their arthropod vectors. *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis*, S. 251–278.
- [Pietsch et al., 2002] Pietsch, M.; Vogt, M.; Süß, J.; Schrader, C.; Treib, J.; Woessner, R.; Bußmann, H. (2002). Untersuchungen zur Bedeutung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Rheinland-Pfalz. *Das Gesundheitswesen*, 64(10):540–543.
- [Pluta et al., 2011] Pluta, S.; Hartelt, K.; Oehme, R.; Kimmig, P.; Mackenstedt, U. (2011). What else besides TBE and Borreliosis? Tick-transmitted pathogens in Germany and beyond. In *Progress in Parasitology*, S. 297–322. Springer.
- [Pöpping & Unterberger, 2010] Pöpping, B.; Unterberger, C. (2010). Extraktion von DNA. In *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*, S. 19. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [Ramsey et al., 2002] Ramsey, A. H.; Belongia, E. A.; Gale, C. M.; Davis, J. P. (2002). Outcomes of treated human granulocytic ehrlichiosis cases. *Emerging Infect. Dis.*, 8(4):398–401.
- [Randolph et al., 2002] Randolph, S.; Green, R.; Hoodless, A.; Peacey, M. (2002). An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *International journal for parasitology*, 32(8):979–989.
- [Randolph et al., 2000] Randolph, S.; Green, R.; Peacey, M.; Rogers, D. (2000). Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121(01):15–23.
- [Randolph et al., 1999] Randolph, S.; Miklisova, D.; Lysy, J.; Rogers, D.; Labuda, M. (1999). Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*, 118(02):177–186.
- [Randolph, 2008] Randolph, S. E. (2008). Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: consequences of political transition. *Microbes Infect.*, 10(3):209–216.
- [Randolph, 2013] Randolph, S. E. (2013). Ecology of non-nidicolous ticks. In Sonenshine, D.; Roe, R., Ed., *Biol ticks*, Bd. 2, S. 3–60. Oxford University Press.
- [Randolph et al., 2008] Randolph, S. E.; Asokliene, L.; Avsic-Zupanc, T.; Bormane, A.; Burri, C.; Gern, L.; Golovljova, I.; Hubalek, Z.; Knap, N.; Kondrusik, M.; Kupca, A.; Pejcoch, M.; Vasilenko, V.; Zygutiene, M. (2008). Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. *Parasit Vectors*, 1(1):44.
- [Randolph et al., 1996] Randolph, S. E.; Gern, L.; Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*, 12(12):472–479.
- [Rauter & Hartung, 2005] Rauter, C.; Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11):7203–7216.

- [Reye et al., 2013] Reye, A. L.; Stegnyy, V.; Mishaeva, N. P.; Velhin, S.; Hubschen, J. M.; Ignatyev, G.; Muller, C. P. (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS ONE*, 8(1):e54476.
- [Rikihisa, 2011] Rikihisa, Y. (2011). Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(3):469–489.
- [Robert Koch-Institut, 2001] Robert Koch-Institut (2001). Risikogebiete der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) - Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos in Deutschland ermöglicht gezielte Prävention für Exponierte. *Epidemiologisches Bulletin*, 16.
- [Robert Koch-Institut, 2007a] Robert Koch-Institut (2007a). Ein möglicher Vektor: Auwaldzecke – *Dermacentor reticulatus* - Beobachtungen aus Brandenburg. *Epidemiologisches Bulletin*, 14.
- [Robert Koch-Institut, 2007b] Robert Koch-Institut (2007b). Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern gemäß § 4 Abs. 2 des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz). *Epidemiologisches Bulletin*.
- [Robert Koch-Institut, 2008a] Robert Koch-Institut (2008a). FSME: Risikogebiete in Deutschland. Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos der FSME. *Epidemiologisches Bulletin*, 17.
- [Robert Koch-Institut, 2008b] Robert Koch-Institut (2008b). Infektionsgeschehen von besonderer Bedeutung: Auftreten von FSME-Erkrankungen im Saar-Pfalz-Kreis Juni bis Juli 2008. *Epidemiologisches Bulletin*, 38.
- [Robert Koch-Institut, 2009a] Robert Koch-Institut (2009a). Falldefinitionen übertragbarer Krankheiten für den ÖGD: Krankheiten, für die gemäß LVO eine erweiterte Meldepflicht zusätzlich zum IfSG besteht (Stand 2009). *Epidemiologisches Bulletin*, 5.

- [Robert Koch-Institut, 2009b] Robert Koch-Institut (2009b). FSME: Risikogebiete in Deutschland - Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin*, 18.
- [Robert Koch-Institut, 2010] Robert Koch-Institut (2010). Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland - Lyme-Borreliose: Analyse der gemeldeten Erkrankungsfälle der Jahre 2007 bis 2009 aus den sechs östlichen Bundesländern. *Epidemiologisches Bulletin*, 12.
- [Robert Koch-Institut, 2011] Robert Koch-Institut (2011). FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2011). Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin*, 17.
- [Robert Koch-Institut, 2012] Robert Koch-Institut (2012). FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Mai 2012), Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin*, 21.
- [Robert Koch-Institut, 2015] Robert Koch-Institut (2015). FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Mai 2015). Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin*, 21.
- [Robert Koch-Institut, SurvStat@RKI] Robert Koch-Institut, SurvStat@RKI. www3.rki.de/SurvStat. abgerufen am 11.04.2014.
- [Rubel et al., 2014] Rubel, F.; Brugger, K.; Monazahian, M.; Habedank, B.; Dautel, H.; Leverenz, S.; Kahl, O. (2014). The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasit Vectors*, 7:477.
- [Schaarschmidt et al., 2001] Schaarschmidt, D.; Oehme, R.; Kimmig, P.; Hesch, R.-D. D.; Englisch, S. (2001). Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *European journal of epidemiology*, 17(12):1067–1074.
- [Scharf et al., 2011] Scharf, W.; Schauer, S.; Freyburger, F.; Petrovec, M.; Schaarschmidt-Kiener, D.; Liebisch, G.; Runge, M.; Ganter, M.; Kehl, A.; Dumler, J. S.; Garcia-Perez, A. L.; Jensen, J.; Fingerle, V.; Meli, M. L.; Ensser, A.; Stuenkel, S.; von Loewenich, F. D. (2011). Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J. Clin. Microbiol.*, 49(3):790–796.

- [Schicht et al., 2011] Schicht, S.; Junge, S.; Schnieder, T.; Strube, C. (2011). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the hard tick *Ixodes ricinus* in the city of Hanover (Germany). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(12):1595–1597.
- [Schorn et al., 2011] Schorn, S.; Pfister, K.; Reulen, H.; Mahling, M.; Manitz, J.; Thiel, C.; Silaghi, C. (2011). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 2(4):196–203.
- [Schuijt et al., 2011] Schuijt, T. J.; Hovius, J. W.; van der Poll, T.; van Dam, A. P.; Fikrig, E. (2011). Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends Parasitol.*, 27(1):40–47.
- [Schulz et al., 2014] Schulz, M.; Mahling, M.; Pfister, K. (2014). Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J. Vector Ecol.*, 39(1):56–65.
- [Schwaiger & Cassinotti, 2003] Schwaiger, M.; Cassinotti, P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, 27(2):136–145.
- [Schwaiger et al., 2001] Schwaiger, M.; Péter, O.; Cassinotti, P. (2001). Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(9):461–469.
- [Silaghi et al., 2008] Silaghi, C.; Gilles, J.; Hohle, M.; Fingerle, V.; Just, F. T.; Pfister, K. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerging Infect. Dis.*, 14(6):972–974.
- [Silaghi et al., 2012] Silaghi, C.; Woll, D.; Hamel, D.; Pfister, K.; Mahling, M.; Pfeffer, M. (2012). *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents—analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors*, 5:191.
- [Spektrum.de, a] Spektrum.de, . Sensille. <http://www.spektrum.de/magazin/mechanosensoren-im-aussenskelett-von-gliederfuessern/823313>. abgerufen am 22.01.2016.

- [Spektrum.de, b] Spektrum.de, . Ökoton. www.spektrum.de/lexikon/geowissenschaften/oekoton/11529. abgerufen am 10.04.2015.
- [Stanek et al., 2011] Stanek, G.; Fingerle, V.; Hunfeld, K.-P.; Jaulhac, B.; Kaiser, R.; Krause, A.; Kristoferitsch, W.; O’Connell, S.; Ornstein, K.; Strle, F.; others (2011). Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1):69–79.
- [Stanek et al., 2012] Stanek, G.; Wormser, G. P.; Gray, J.; Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814):461–473.
- [Stuen et al., 2013] Stuen, S.; Granquist, E. G.; Silaghi, C. (2013). Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:31.
- [Süss, 2003] Süss, J. (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 21 Suppl 1:19–35.
- [Süss, 2008] Süss, J. (2008). Zur FSMEV-Prävalenz im Saarland. *unveröffentlichter Bericht*.
- [Süss, 2011] Süss, J. (2011). Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(1):2–15.
- [Süss et al., 1996] Süss, J.; Béziat, P.; Rohr, H.; Treib, J.; Haass, A. (1996). Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal “Länder” of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR) — Characterization of the virus. *Infection*, 24(5):403–404.
- [Süss et al., 2006] Süss, J.; Klaus, C.; Diller, R.; Schrader, C.; Wohanka, N.; Abel, U. (2006). TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in Ixodes ricinus removed from humans. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296 Suppl 40:63–68.
- [Süss et al., 2008] Süss, J.; Klaus, C.; Gerstengarbe, F. W.; Werner, P. C. (2008). What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med*, 15(1):39–45.

- [Süss et al., 2002] Süss, J.; Schrader, C.; Abel, U.; Bormane, A.; Duks, A.; Kalnina, V. (2002). Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997–2000). *International Journal of Medical Microbiology*, 291, Supplement 33:34 – 42.
- [Süss et al., 2004] Süss, J.; Schrader, C.; Falk, U.; Wohanka, N. (2004). Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany—epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293 Suppl 37:69–79.
- [Tack et al., 2011] Tack, W.; Madder, M.; De Frenne, P.; Vanhellemont, M.; Gruwez, R.; Verheyen, K. (2011). The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. *Exp. Appl. Acarol.*, 54(3):285–292.
- [Thomas et al., 2009] Thomas, R. J.; Dumler, J. S.; Carlyon, J. A. (2009). Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7(6):709–722.
- [Townsend et al., 2014] Townsend, R. L.; Moritz, E. D.; Fialkow, L. B.; Berardi, V.; Stramer, S. L. (2014). Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. *Transfusion*, 54(11):2828–2832.
- [Treib, 1994] Treib, J. (1994). First case of tick-borne encephalitis (TBE) in the Saarland. *Infection*, 22(5):368–369.
- [Treib et al., 1996] Treib, J.; Haass, A.; Mueller-Lantzsch, N.; Ehrfeld, H.; Mueller-Rheiland, D.; Woessner, R.; Holzer, G.; Schimrigk, K. (1996). Tick-borne encephalitis in the Saarland and the Rhineland-Palatinate. *Infection*, 24(3):242–244.
- [Von Loewenich et al., 2003] Von Loewenich, F.; Stumpf, G.; Baumgarten, B.; Röllinghoff, M.; Dumler, J.; Bogdan, C. (2003). A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(5):303–305.
- [von Wissmann et al., 2015] von Wissmann, B.; Hautmann, W.; Sing, A.; Hizo-Teufel, C.; Fingerle, V. (2015). Assessing the risk of human granulocytic ana-

- plasmosis and lyme borreliosis after a tick bite in Bavaria, Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(7):736–741.
- [Voordouw, 2015] Voordouw, M. J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(02):290–302.
- [Wallner et al., 1996] Wallner, G.; Mandl, C. W.; Ecker, M.; Holzmann, H.; Stiasny, K.; Kunz, C.; Heinz, F. X. (1996). Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.*, 77 (Pt 5):1035–1042.
- [Wallner et al., 1995] Wallner, G.; Mandl, C. W.; Kunz, C.; Heinz, F. X. (1995). The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 213(1):169–178.
- [Wilking et al., 2015] Wilking, H.; Fingerle, V.; Klier, C.; Thamm, M.; Stark, K. (2015). Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011. *Emerging infectious diseases*, 21(1):107.
- [Wilking & Stark, 2014] Wilking, H.; Stark, K. (2014). Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009-2012. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(3):219–224.
- [Wilson, 1927] Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association*, 22(158):209–212.
- [Woessner et al., 2001a] Woessner, R.; Gaertner, B. C.; Grauer, M. T.; Weber, K.; Mueller-Lantzsch, N.; Hunfeld, K. P.; Treib, J. (2001a). Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection*, 29(5):271–273.
- [Woessner et al., 2000] Woessner, R.; Grauer, M.; Falk, U.; Gaertner, B.; Mueller-Lantzsch, N.; Haaß, A.; Treib, J. (2000). Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Niedrigrisikogebieten. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 125(19):599–602.

- [Woessner et al., 2001b] Woessner, R.; Mühl, A.; von Arnim, W.; Treib, J. (2001b). Autochthone Fälle der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Rheinland-Pfalz. *Der Nervenarzt*, 72(2):147–149.
- [Woldehiwet, 2010] Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.*, 167(2-4):108–122.
- [Zhang et al., 2008] Zhang, L.; Liu, Y.; Ni, D.; Li, Q.; Yu, Y.; Yu, X. J.; Wan, K.; Li, D.; Liang, G.; Jiang, X.; Jing, H.; Run, J.; Luan, M.; Fu, X.; Zhang, J.; Yang, W.; Wang, Y.; Dumler, J. S.; Feng, Z.; Ren, J.; Xu, J. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*, 300(19):2263–2270.
- [Zollner et al., 1998] Zollner, A.; von Arnim, W.; Treib, J. (1998). Frühsommer-Meningoenzephalitis in Rheinland-Pfalz. *Aktuelle Neurologie*, 25(5):193–194.

G Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Anaplasma</i>
<i>B.</i>	<i>Borellia</i>
BAB.	Bundesautobahn
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
<i>bp</i>	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_p	<i>crossing point</i>
C_t	<i>cycle threshold</i>
<i>D.</i>	<i>Dermacentor</i>
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Ehrlichia</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfert
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
FSME-EU	zentraleuropäischer Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
HGA	Humane Granulozytäre Anaplasmose
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
<i>kb</i>	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
LK	Landkreis
mSP	<i>major surface protein</i>
NCR	nicht kodierende Region (non-coding region)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
RKI	Robert Koch- Institut
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem

H Anhang

H.1 Sammelorte

H.1.1 Rheinland-Pfalz

Sammelort		Ausgangspunkt der Sammlung (GPS-Daten)	
1	A 62: Rastplatz Potzberg	49°29'31.74"N	07°24'11.51"E
1N	Idar-Oberstein : Schleiferweg	49°43'49.07"N	07°17'05.61"E
2	Idar-Oberstein : Weiher-Schleife	49°43'51.39"N	07°17'09.20"E
2N	Idar-Oberstein : Am Unterstberg	49°44'23.42"N	07°16'53.70"E
3	Idar-Oberstein, Stadtteil Kirchenbollenbach : Sportplatz	49°41'19.18"N	07°24'48.34"E
4	Idar-Oberstein, Stadtteil Mittelbollenbach : Spielplatz	49°41'38.69"N	07°24'14.55"E
5	Idar-Oberstein, Stadtteil Mittelbollenbach : Waldweg	49°41'31.00"N	07°24'02.24"E
6	Idar-Oberstein, Stadtteil Nahbollenbach : Wassertretplatz	49°42'11.74"N	07°23'20.51"E

Tabelle 17: GPS-Daten der Ausgangspunkte der Sammlung in Rheinland-Pfalz

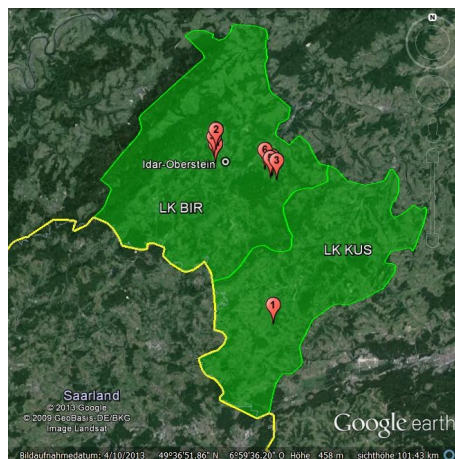


Abbildung 9: Rheinland-Pfalz, Landkreise Birkenfeld (LK BIR) und Kusel (LK KUS): Verteilung der Sammelorte 1 bis 6, Quelle: Google Earth (23.02.2014)



Abbildung 10: Sammelort 1, Rastplatz Potzberg (Landkreis Kusel, Rheinland-Pfalz)
Quelle: Google Earth (23.02.2014)

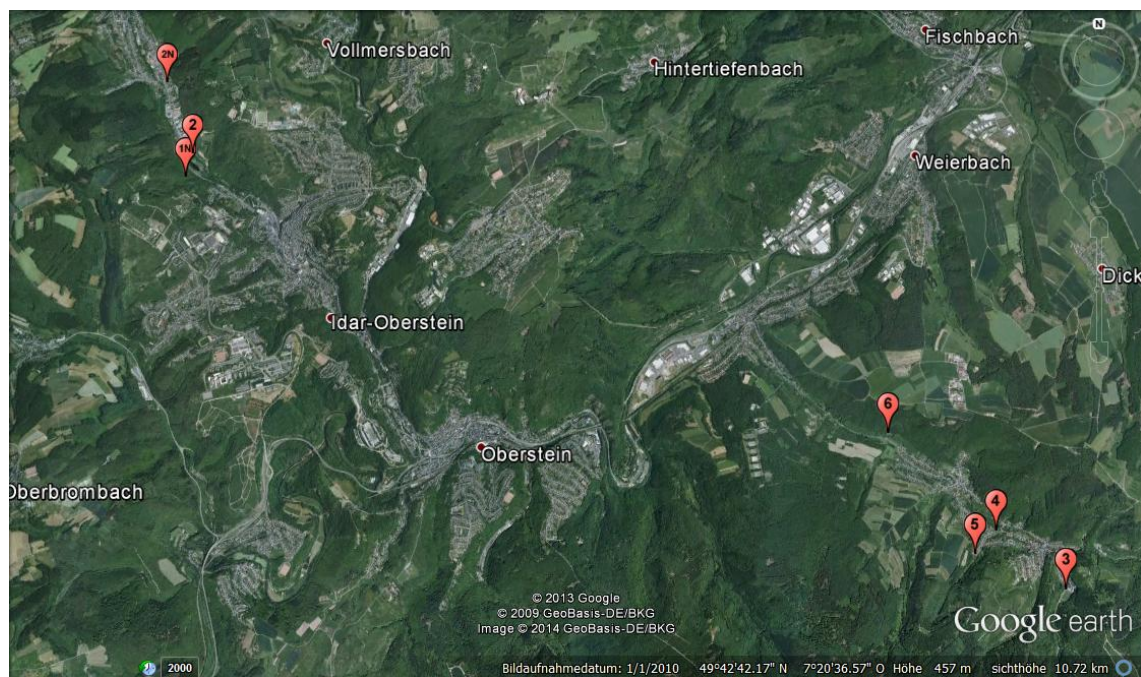


Abbildung 11: Sammelorte 1N-6 im Stadtgebiet von Idar-Oberstein (Rheinland-Pfalz, Landkreis Birkenfeld) Quelle: Google Earth (23.02.2014)

H.1.2 Saarland

Sammelort		Ausgangspunkt der Sammlung (GPS-Daten)	
7	A1: Rastplatz Schellenbach	49°26'14.93"N	06°58'30.62"E
8	Straße Elversberg - St. Ingbert: drei Waldwege	49°17'39.23"N	07°06'44.64"E
9	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Glashütter Weiher	49°17'47.09"N	07°10'22.66"E
10	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Feld am Ortseingang von Rohrbach	49°17'10.19"N	07°08'50.92"E
11	St. Ingbert: Gehnbachstraße	49°16'49.49"N	07°05'48.99"E
12	St. Ingbert, Ortsteil Rohrbach: Weingangsweg	49°17'01.94"N	07°10'13.67"E
13	Nohfelden, Ortsteil Gonnweiler: Bostalsee	49°33'46.10"N	07°04'33.40"E

Tabelle 18: GPS-Daten der Ausgangspunkte der Sammlung im Saarland

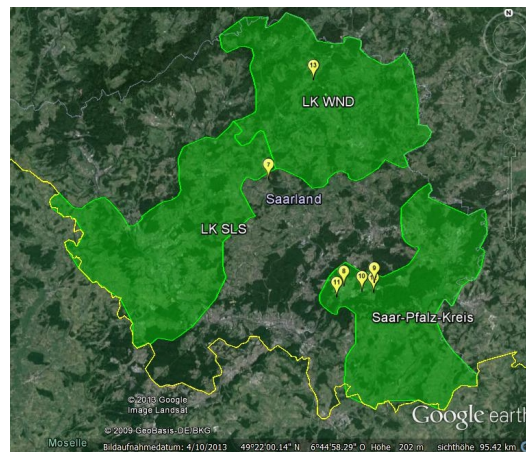


Abbildung 12: Saarland, Landkreise Saarlouis (SLS), St. Wendel (WND) und Saarpfalz-Kreis: Verteilung der Sammelorte 7-13, Quelle: Google Earth (23.03.2014)

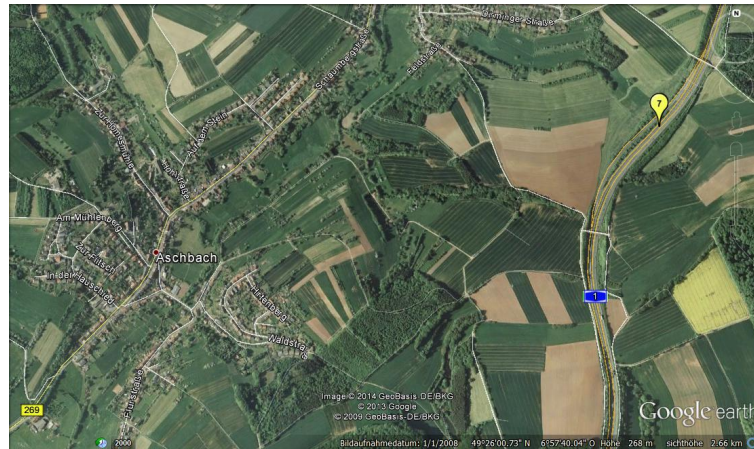


Abbildung 13: Sammelort 7, Rastplatz Schellenbach (Landkreis Saarlouis, Saarland)
Quelle: Google Earth (23.02.2014)

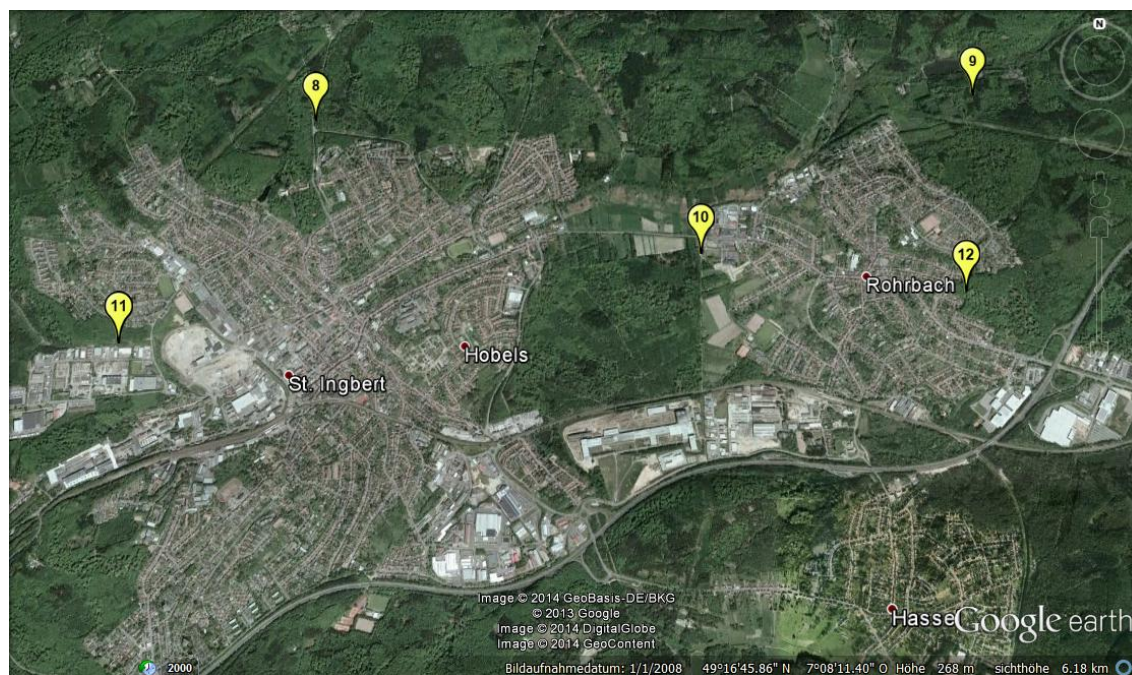


Abbildung 14: Sammelorte 8-12 im Stadtgebiet St. Ingbert (Saarpfalz-Kreis, Saarland) Quelle: Google Earth (23.02.2014)

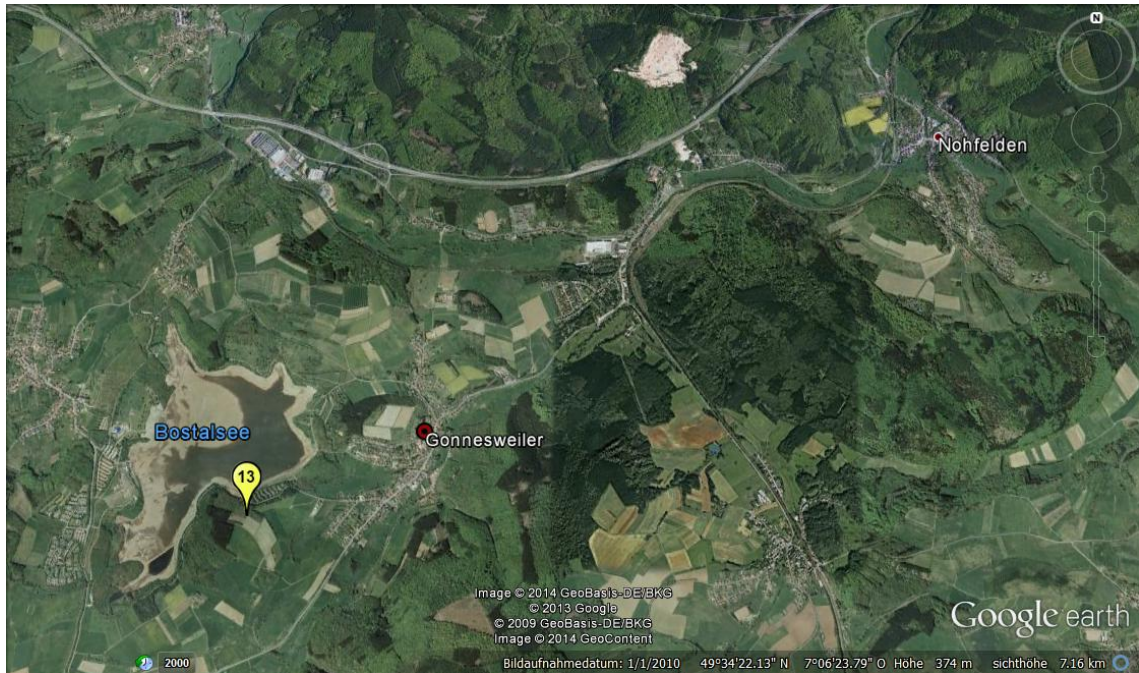


Abbildung 15: Sammelort 13 in Gonnweiler (Verbandsgemeinde Nohfelden, Landkreis St. Wendel, Saarland), Quelle: Google Earth (23.02.2014)

I Danksagung

Mein Dank gilt allen, die am Gelingen dieser Arbeit Teil hatten, insbesondere

- Frau Prof. Dr. S. Smola (Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes), für das Ermöglichen dieser Arbeit,
- dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. J. Rissland (Institut für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes), für die Begutachtung dieser Arbeit und die stete, motivierende Unterstützung,
- den MitarbeiterInnen des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, im Besonderen Frau I. Kaffenberger, die mich in die Methodik der PCR und Nukleinsäureextraktion eingeführt hat.
- den MitarbeiterInnen des Instituts für Hygiene und Infektionsschutz, Abteilung Humanmedizin des Landesuntersuchungsamtes in Koblenz unter der Leitung von Dr. M. Vogt, dabei vor allem Herrn Dr. H. G. Meyer und Frau M. Cremer-Kahn,
- Herrn Prof. Dr. Mehlhorn und seinen Mitarbeitern, die die Sammlung und entomologische Zuordnung der Zecken übernommen haben,
- Frau Dr. C. Klaus für ihre Hilfe bei der Etablierung der FSMEV RT-PCR,
- sowie Herrn Prof. M. Niedrig (Robert Koch-Institut), Herrn PD Dr. G. Dobler (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München) und Herrn Dr. B. Hoffmann (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) für die Überlassung von Positivkontrollen.

Finanziert wurde die vorliegende Arbeit durch die Landesregierungen von Rheinland-Pfalz und dem Saarland, repräsentiert in Rheinland-Pfalz durch die Ministerien für Soziales, Arbeit, Gesundheit und Demografie sowie für Wirtschaft, Energie, Klimaschutz und Landesplanung bzw. im Saarland durch die Ministerien für Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie, sowie für Wirtschaft, Arbeit, Energie und Verkehr.

J Publikationsliste

- Mehlhorn, H.; Mehlhorn, T.; Müller, M.; Vogt, M.; Rissland, J.(2015):Tick survey for prevalent pathogens in peri-urban recreation sites in Saarland and Rhineland-Palatinate (Germany); Parasitology Research, Bd. 115(3): S. 1167-72